



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE



وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الإخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة والحياة

قسم الكيمياء الحيوية والبيولوجيا الخلوية والجزيئية
Département de Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie Moléculaire et Santé

Intitulé :

**Appréciation de la diversité génétique de cinq espèces
du genre *Medicago* L. collectées dans le Nord Algérien
par les marqueurs protéiques (Globulines)**

Présenté et soutenu par : Kehal Sarah
Dani Ouarda

Le : 16/06/2015

Jury d'évaluation :

Présidente du jury : Bellil Inès (Maitre de Conférences - UFM Constantine).

Rapporteur : Khelifi Douadi (Professeur - UFM Constantine).

Examinatrice : Benhamdi Asma (Maitre de Conférences - UFM Constantine).

Année universitaire
2014 - 2015

Remerciements

Au-delà d'un véritable défi scientifique, la réalisation d'un mémoire s'inscrit comme une réelle aventure humaine. Ce travail a été réalisé grâce au concours de nombreuses personnes que nous tenons à remercier dans ces quelques lignes.

Nous remercions s'adressent en premier lieu aux financeurs de ces travaux : laboratoire de biochimie génétique et biotechnologies végétales de l'université des frères Mentouri de Constantine.

Nous aimerions aussi remercier Monsieur khelifi Douadi, notre encadreur de mémoire, d'une part pour nous avoir offert l'opportunité de réaliser ce projet de recherche au sein de son laboratoire. Sa disponibilité, son sens de critique ne se sont jamais démentis et ont permis à se mémoire d'évoluer dans la compréhension de son sujet, et d'autre part nous vous remercions pour le soutien que vous nous avez apporté. Veuillez accepter cher maitre notre profond respect.

Nous tenons à exprimer tous nous remercions à Melle. Imane Medoukali, notre Co-encadreur de mémoire. Son expertise dans le domaine de la biochimie génétique et biotechnologies végétales, sa rigueur scientifique ainsi que sa grande disponibilité tout au long de ce mémoire (même durant ses vacances et week-ends) et particulièrement lors delà rédaction, ont grandement contribué à l'aboutissement de ce mémoire. C'est toujours avec enthousiasme qu'elle nous a accueillis dans son bureau pour nous aider à progresser dans la réflexion scientifique. Nous remercions également de nous avoir laissés une grande autonomie dans la gestion de notre projet de mémoire tout en restant très présentes.

Nous désirons également exprimer nos remercions à Mlle. Bellil Inès, Maitre de conférences à l'université des frères Mentouri de Constantine. Nous sommes fières de l'honneur que vous nous faites en acceptant de présider notre jury. Veuillez, accepter chère maitre, l'expression de notre profond respect.

Nous tenons à adresser nos sincères remercions à Melle Benhamdi Asma, Maitre de conférences à l'université des frères Mentouri de Constantine. Nous sommes fières de l'honneur que vous nous faites en acceptant d'examiner et de juger notre travail. Nous avons été comblées par l'enseignement de qualité dont nous avons bénéficié à vos côtés. Vos qualités intellectuelles et vos connaissances larges font de vous un modèle de maitre souhaité par tous les élèves. Veuillez accepter cher maitre. L'expression de notre haute considération.

Nous adressons ici toute notre gratitude à l'équipe de laboratoire de biochimie génétique et biotechnologie végétale, aux serristes et à tous les membres de la plate-forme de biochimie moléculaire et santé : Mr. Bensegueni, Melle. Klibet, Melle. Bahi, Mr. Necib, Mr. Merghem et Mr. Nouadri

Nous remercions les amis et camarades que nous avons rencontré pendant ce mémoire, ainsi que l'ensemble du master des autres branches que nous pouvons côtoyer.

Enfin, ce travail, nous le devons à nos parents qui nous ont toujours soutenus pendant tous ces mois, mais aussi tout au long de nos études.

Dédicaces

A mon très cher père qui était toujours présent avec son soutien moral et psychique.

A ma très chère mère, pour ses prières et ses sacrifices

A mon ange lamis que dieux la protège pour nous.

A vous également :

Ma chère sœur : Rym,

Mes chers frères : Sammy et djalel.

Ma chère amie et binôme : Amira

Et de peur d'oublier quelqu'un je ne citerai personne.

A mes collègues et ami (es)

KEHAL SARAH

Dédicaces

Au nom de dieu je dédie ce travail en premier lieu à mes parents, spécialement a ma chère maman qui es toujours présente à mes cotés

pour me soutenir.

A

mon ange racim que dieux le protège pour nous.

A ma sœur sandra et mon frère.

A toute ma famille

A toutes les personnes qui m'ont aidé, soutenu et encouragé, je vous remercie.

mon binome sarah qu'on a partagé ensemble tout les moments de travail

A

Mes amis (es) et mes collègues

Dani warda

Liste des abréviations**Liste des figures****Liste des tableaux**

Introduction	1
Chapitre I : Revue bibliographique	
I. La famille des légumineuses	3
II. Le genre <i>Medicago</i> L.	4
II.1. Taxonomie et génétique	4
II.2. Evolution et origine géographique	5
II.3. Aire de répartition du genre <i>Medicago</i>	6
II.4. Description botanique de la plante <i>Medicago</i>	6
II.5. Le cycle de développement	7
II.6. Importance du genre <i>Medicago</i>	7
II.7. Les espèces spontanées rencontrées en Algérie	8
III. Les espèces étudiées	9
III.1. <i>Medicago truncatula</i>	9
III.2. <i>Medicago ciliaris</i>	9
III.3. <i>Medicago orbicularis</i>	9
III.4. <i>Medicago murex</i>	9
III.5. <i>Medicago rigidula</i>	10
IV. Polymorphisme et marqueurs génétiques	10

IV.1. Les marqueurs moléculaires	10
IV.2. Les marqueurs biochimiques	11
IV.2.1. Les marqueurs enzymatiques	11
IV.2.2. Les marqueurs protéiques	11
V. Les globulines	12

Chapitre II : Matériel et Méthodes

I. Matériel végétal	13
II. Méthodes d'étude.....	13
II.1. Extraction séquentielle des globulines	13
II.1.1. Préparation des échantillons.....	15
II.1.2. De-lipidation de la farine	15
II.1.3. Elimination des Albumines	15
II.1.4. Extraction des globulines	15
II.1.5. Préparation des extraits pour l'électrophorèse.....	15
II.2. Technique d'électrophorèse	15
II.2.1. Principe	16
II.2.2. préparation des gels.....	16
II.2.3. tampon d'électrophorèse	17
II.2.4. conditions de migration	17
II.2.5 fixation, coloration et décoloration.....	17
II.3. Analyse des données.....	17

Chapitre III : Résultats et discussion

I. Fractionnement des Globulines et lecture des profils électrophorétiques	18
II. Analyse de la diversité génétique des populations Algériennes du genre <i>Medicago</i> ...	20
II.1. Polymorphisme interspécifique	20
II.1.1. Fréquences des globulines	20
II.1.2. Distances génétiques	21
II.1.3. Classification hiérarchique.....	22
II.2. Polymorphisme intra-spécifique.	23
II.2.1. Chez l'espèce <i>M. truncatula</i>	23
a. Fréquences des globulines	23
b. Distances génétiques.	24
c. Classification hiérarchique	24
II.2.2. Chez l'espèce <i>M. ciliaris</i>	26
a. Fréquences des globulines	26
b. Distances génétiques	27
c. Classification hiérarchique	28
II.2.3 Chez l'espèce <i>M. orbicularis</i>	29
a. Fréquences des globulines.....	29
b. Distances génétiques.....	30
c. Classification hiérarchique	31
II.2.4. Chez l'espèce <i>M. murex</i>	32
a. Fréquences des globulines.....	32
b. Distances génétiques.....	33

c. Classification hiérarchique.....	34
II.2.5 Chez l'espèce <i>M. rigidula</i>	34
a. Fréquences des globulines.....	35
b. Distances génétiques.....	35
c. Classification hiérarchique.....	36
III. Discussion.....	37
Conclusion et perspectives.....	39
Références bibliographiques.....	40
Annexes	
Résumés	

μl	Micro litre
AA	Acide aminé
ADN	L'acide désoxyribonucléique
APS	Amonium persulfate
EDTA	Éthylène Diamine Tétra-Acétique
EGTA	ethylene glycol tetraacetic acid
KDa	Kilo dalton
mA	Milli Ampère
Mc	<i>Medicago ciliaris</i>
mg	Milli gramme
min	minute
mM	Milli molaire
Mmx	<i>Medicago murex</i>
Mo	<i>Medicago orbicularis</i>
MRg	<i>Medicago rigidula</i>
Mt	<i>Medicago truncatula</i>
PMSF	Phenylmethanesulfonylfluoride
rpm	Rotation par minute
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
TCA	Trichloracétique Acide
TEMED	Tétraméthylléthylènediamine
TRIS	Tri hydroxyl methyl amino methane
UPGMA	unweighted pair group method arithmetic average
V	Volt

Liste des figures

- Figure 1.** Classification des légumineuses de la famille des papilionoideae
- Figure 2.** Origine géographique des espèces annuelles et pérennes du genre *Medicago* L
- Figure 3.** Distribution mondiale du genre *Medicago* L.
- Figure 4.** Cycle de développement des espèces du genre *Medicago* L.
- Figure 5.** *M. truncatula* : gousses, fleur et graines
- Figure 6.** *M. ciliaris* : gousse, fleur et feuilles
- Figure 7.** *M. orbicularis* : gousse et feuilles
- Figure 8.** *M. murex* : gousses et feuilles
- Figure 9.** *M. rigidula* : gousse, feuilles
- Figure 10.** Localités géographiques des cinq espèces du genre *Medicago* L. collectées dans le Nord Algérien
- Figure 11.** Exemple de profils électrophorétiques des globulines obtenus par SDS-PAGE dans les conditions dénaturantes non réductrices chez *M. ciliaris*
- Figure 12.** Classification hiérarchique en UPGMA des cinq espèces du genre *Medicago* basée sur le polymorphisme des globulines
- Figure 13.** Classification hiérarchique en UPGMA des 29 accessions de *M. truncatula* basée sur le polymorphisme des globulines
- Figure 14.** Classification hiérarchique en UPGMA des 19 accessions de *M. ciliaris* basée sur le polymorphisme des globulines
- Figure 15.** Classification hiérarchique en UPGMA des 18 accessions de *M. orbicularis* basée sur le polymorphisme des globulines
- Figure 16.** Classification hiérarchique en UPGMA des 12 accessions de *M. murex* basée sur le polymorphisme des globulines
- Figure 17.** Classification hiérarchique en UPGMA des trois accessions de *M. rigidula* basée sur le polymorphisme des globulines

Liste des tableaux

Tableau 1. Les espèces spontanées rencontrées en Algérie (Hierche, 2006).....	8
Tableau 2. Sites de collecte et leurs paramètres bioclimatiques des cinq espèces utilisées dans cette étude.....	14
Tableau 3. Fréquences des globulines dans les cinq espèces du genre <i>Medicago</i> L.....	21
Tableau 4. Distances génétiques calculées entre les cinq espèces du genre <i>Medicago</i> L.....	22
Tableau 5. Fréquences des 38 globulines observées chez les accessions de <i>M. truncatula</i>	23
Tableau 6. Distances génétiques obtenues entre les 29 accessions de <i>M. Truncatula</i>	25
Tableau 7. Fréquences des 52 globulines observées chez les accessions de <i>M. ciliaris</i>	26
Tableau 8. Distances génétiques obtenues entre les 19 accessions de <i>M. ciliaris</i>	28
Tableau 9. Fréquences des 46 globulines observées chez les accessions de <i>M. orbicularis</i> ...	30
Tableau 10. Distances génétique obtenues entre les 18 accessions de <i>M. orbicularis</i>	31
Tableau 11. Fréquences des 35 globulines observées chez les accessions de <i>M. murex</i>	32
Tableau 12. Distances génétiques obtenues entre les 12 accessions de <i>M. murex</i>	32
Tableau 13. Fréquences des 28 globulines observées chez les accessions de <i>M. rigidula</i> ...	34
Tableau 14. Distances génétiques obtenues entre les trois accessions de <i>M. rigidula</i>	35

La flore d'Algérie est particulièrement riche en espèces, la diversité de l'Algérie en climats et sols lui donne une place privilégiée pour la culture et l'exploitation des plantes. Un très grand nombre de ces espèces pousses à l'état naturel et endémique, certaines se révèlent d'une grande valeur agronomique, car elles sont utilisées comme fourrage pour bétail ou sous forme de plantes alimentaires, d'autres ont une application médicinale (Armani, 2006).

Le genre *Medicago* renferme 34 espèces annuelles et 21 espèces pérennes qui présentent un intérêt agro-économique du fait de leur excellente qualité fourragère et de l'enrichissement de la fertilité du sol qu'elles assurent (L'Alaoui et *al.*, 1997). En Algérie, ces plantes assurent l'amélioration de la flore des jachères pâturées, entrent facilement dans la rotation avec les céréales se régénèrent par auto-semis et constituent une bonne réserve de semences dans le sol (Chebouti et *al.*, 2000). Par ailleurs, des travaux ont été entrepris pour utiliser des extraits foliaires des luzernes (cas de *M. sativa*) comme aliment destiné à des populations souffrant de carence alimentaire forte, en particulier chez l'enfant (Hireche, 2006).

La description de la diversité génétique à différents niveaux hiérarchiques d'organisations peut grandement bénéficier à la biologie des populations et de l'évolution. Cette discipline contribue à un concept intégré de la conservation de la biodiversité. Ainsi, l'information génétique est devenue un outil important pour l'étude de la variabilité génétique, et aussi pour la biologie de la conservation, au même titre que les considérations écologiques et économiques. Et pour maintenir cette diversité génétique (intra et interspécifique) il est nécessaire de décrire la diversité actuelle à l'intérieur et entre les populations des différentes espèces de plantes.

Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à l'analyse du polymorphisme des globulines au sein de cinq espèces du genre *Medicago*, pour estimer la variabilité génétique intra et interspécifique. Pour cela nous avons utilisé la technique d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide. En effet cette technique est de plus en plus utilisée pour identifier des variétés, contrôler des semences et élucider certains problèmes taxonomiques (Trifi et *al.*, 1983).

Dans notre recherche Les études bibliographiques sont présentées dans le premier chapitre de ce mémoire, d'où il présente d'une façon général l'origine du genre *Medicago*, répartition, caractéristiques botaniques, génétique et physiologiques ainsi leur intérêt et utilisation.

Le deuxième chapitre de ce mémoire décrit d'une part le matériel végétal, les sites de collecte, les protocoles et les techniques biochimiques utilisées et d'autre part l'étude du polymorphisme protéique en vue de l'appréciation de la variabilité génétique des luzernes.

Le troisième chapitre de ce mémoire est consacré à la présentation, l'interprétation et la discussion des résultats obtenus.

I. La famille des légumineuses

Les légumineuses constituent des familles les plus abondantes et diversifiées des plantes supérieures, est la troisième superfamille par ordre d'importance chez les angiospermes, sont les plantes dont le fruits et contenu dans une gousse

Elles comprennent plus de 750 genres et 17 000 à 20000 espèces, des plantes herbacées annuelles que des plantes ligneuses, elles colonisent aussi bien les régions tempérés ou arctique du globe terrestre. Cette famille présente une importance économique majeure, de nombreuses espèces constituent des ressources en fourrage (luzerne, trèfle, sainfoin), bois (palissandres), aliments (soja, haricot, arachides) ou présentent des propriétés médicinales, horticoles (mimosas) ou de colorants (indigo).

Sur la base de leurs caractéristiques florales, les botanistes s'entendent à regrouper ces espèces en trois sous-familles (Doyle, 1994 ; de Ladjudie et *al.*, 1998 ; Dommergues et *al.*, 1999 ; Doyle et Lucknow, 2003) :

- La sous-famille des Mimosoideae, comprend environ 3000 espèces regroupées dans environ 77 genres (Cannon, 2008).
- La sous-famille des Caesalpinoideae, considérée comme la plus primitive, regroupe environ 4200 espèces dans environ 162 genres (Simon, 2005 ; Cannon, 2008).
- La sous-famille Papilionoideae, d'une évolution plus récente, comprend environ 14 000 espèces aux fleurs irrégulières, regroupées dans environ 476 genres (Lewis et *al.*, 2003).

La famille des légumineuses est l'une des familles végétales les plus utiles à l'homme, que ce soit dans le domaine alimentaires, industrielles, économique, écologique ou agronomique :

- Les graines des légumineuses sont des aliments d'excellente qualité, elles constituent une source majeure de protéines et d'huiles végétales selon la légumineuse considérée. Les protéines peuvent représenter de 17 et 27 % du poids des graines soit deux à trois fois plus que les graines des céréales majeures (Graham et Vance, 2003 ; Simon, 2005 ; Fyad-Lameche, 2007)
- Dans l'industrie, les légumineuses représentent une source très importante de matière première : pour la production de dérivés alimentaires tels que les huiles, les farines et les conserves... et pour la production des produits cosmétiques et pharmaceutiques (Lee et *al.*, 2007).

- L'utilisation des systèmes de rotation légumineuse-céréales, permet de substantielles économies d'engrais azotés, d'épargner une grosse part de l'énergie fossile et conduit à une protection de l'environnement et au développement agriculture équilibrées (Saga et Johri, 2003)
- les légumineuses améliorent les pratiques agricoles et contribuent au maintien de la fertilité des sols par l'accumulation des concentrations importantes d'azote dans leurs tissus (Simon, 2005).
- écologiquement, les légumineuses sont responsable pour une partie substantielle de la conversion du flux global de l'azote atmosphérique en forme fixe tel que l'azote ammoniacal qui est à son tour converti en composés organiques assimilables (Waniet *al.*, 1995 ; Chalck, 1998).
- Elles jouent aussi des rôles très importants dans la lutte contre l'érosion, la désertification et la dégradation des sols (Thami et El Mzouri, 2000).

II. Le genre *Medicago* L.

Le nom scientifique du genre *Medicago* n'est pas lié à ses propriétés médicinales, mais au fait que la luzerne serait originaire de Médie. Quant au nom vernaculaire, il est emprunté à l'occitan « luserna », qui désigne aussi une partie lumière ou le ver luisant, en raison de l'aspect brillant des graines de la plante.

II.1. Taxonomie et génétique :

Le genre *Medicago* regroupe de nombreuses espèces de plantes proches des genres *Trifolium*, *Melilotus* et *Trigonella*, appartenant comme eux à la famille des fabacées (ou légumineuses) sous-famille des papilionoideae (Fig. 1). Cette dernière famille est de loin la plus abondante, avec plus de 1200 espèces.

Le genre *Medicago* présente 56 espèces annuelles et pérennes plus une seule espèce arbustive répertoriée *Medicago arborea*. Les espèces annuelles sont pour leur majorité des diploïdes ($2n=16$ ou $2n=14$) alors que les espèces pérennes sont des tétraploïdes allogames ($2n=4x=32$ dans certains cas) (Négre, 1959 ; Heyn, 1963 ; Lesins et Lesins, 1979 ; Small et Jomph, 1989).

La position systématique du genre *Medicago* est représentée comme suit d'après (Small et Jompe, 1989)

Règne :	Plantea
Embranchement :	Spermatophytes
Sous-embranchement :	Angiospermes
Classe :	Dicotylédones
sous- classe :	Rosidées
Ordre :	Fabale
Famille :	Fabaceae
sous- famille :	Faboideae
Tribus :	Trifolieae
Genre:	<i>Medicago</i>

II.2. Evolution et origine géographique

D'après Lesins et Lesins (1979), les formes les plus anciennes des espèces de *Medicago* auraient été pérennes probablement ligneuses et allogames, les formes annuelles se seraient différenciées il y a 6 ou 7 millions d'années au Miocène à l'occasion des transgressions marines du bassin méditerranéen.

L'évolution du genre *Medicago* s'est accompagnée de modifications morphologiques et biologiques. Les formes annuelles sont strictement autogames très souvent diploïdes et ont généralement des graines plus grosses que les espèces pérennes.

La plus vieille référence connue de culture de la luzerne cultivée (*Medicago sativa* L) date de 1 300 ans avant J.C. en Turquie. Mais sans extension en Europe n'a d'été réellement qu'avec l'Empire romain (Génier et al., 1992), même si les phéniciens l'ont introduit dans le bassin méditerranéen occidental. Elle se répand ensuite et à la fin du XVIII^e siècle sa zone de culture est mondiale (Michaud et al. 1988).

Les travaux de Mathieu (2003) et Hireche (2006) affirment qu'au cours du XIX^e siècle, Les luzernes (les espèces du genre *Medicago*) ont conquis l'ensemble de la zone

méditerranéenne, elles ont ensuite envahi d'autres parties du monde (Fig. 2), en particulier les continents américains et australiens à l'occasion des différents courants de la colonisation humaine (Delalande et *al.*, 2007).

Les luzernes s'accommodent des sécheresses périodiques, elles sont adaptées à tous les types de sols qui ne sont pas trop humides (Lapeyronie, 1982). La plupart des espèces du genre *Medicago* sont connues depuis le XVI^{ème} siècle, Linné (1753), dans son ouvrage « Species Plantarum », en a décrit 9 espèces avec, pour certaines, plusieurs variétés.

L'origine géographique de toutes les espèces du genre *Medicago* semble être « le croissant fertile » recouvrant les pays ou régions actuelles de Turquie, d'Iran, d'Irak du Sud du Caucase et du pourtour méditerranéen ces espèces ont ensuite conquis l'ensemble de la zone méditerranéenne et les steppes avoisinantes. D'après Derek et Ernest (1997), elles sont originaires d'Europe, d'Asie et d'Afrique et se sont répandues dans d'autres continents sous forme de mauvaises herbes.

II.3. Aire de répartition du genre *Medicago*

Les luzernes annuelles ont parfois des distributions très limitées. Certaines espèces étant endémiques, lors que d'autres sont colonisatrices. Une étude plus précise de la distribution des espèces a été faite à partir des prospections de matériel spontané entreprise depuis de nombreuses années sur l'ensemble du bassin méditerranéen (Prosperi et *al.*, 1991)

La plupart des espèces de *Medicago* sont originaires du bassin méditerranéen et aussi de l'ouest de l'Asie (Lesins et Lesins, 1979). Elles sont naturalisées dans le sud d'Australie ou elles ont été introduites accidentellement dans le XIX^{ème} siècle.

Les espèces de *Medicago* annuelles ont été également introduites dans d'autres régions du monde surtout les régions qui ont un climat ressemblant au bassin méditerranéen par exemple l'Afrique du sud et le Chili (Fig. 3).

II.4. Description botanique de la plante *Medicago*

Les espèces du genre *Medicago* ont de fortes racines Pivotantes pouvant atteindre plusieurs mètres de profondeur, ses tiges portent des feuilles trifoliées à folioles finement dentés au sommet et présente des inflorescences en grappe, les stipules sont larges de forme allongée ou cordiforme. Les fleurs dont la couleur varie du mauve au jaune sont portées sur un long racème qui contient jusqu'à 20 fleurs (Lapeyronie, 1982 ; Mathieu, 2003). La fécondation est allogame chez les espèces vivaces et autogame chez les espèces annuelles (Prosperi et *al.*, 1993). Le fruit est une gousse plus ou moins enroulée, soit en

forme de faucille, soit spiralée (de 1 à 4 spires) parfois épineuse. La graine plus ou moins réniforme est longue d'environ 10 mm (Mathieu, 2003 ; Hireche, 2006). Chez les plantes des espèces annuelles de *Medicago*, la morphologie et l'architecture varient fortement entre les génotypes de la même espèce et elles sont très dépendantes de l'environnement et des conditions de culture.

II.5. Le cycle de développement

D'après Mathieu (2003), le cycle de développement des espèces du genre *Medicago* passe par différents stades végétatifs (Fig. 4)

Stade 1 : La plante est une dicotylédone germination hypogée.

Stade 2 : L'apparition de la première feuille unifoliée.

Stade 3 : Les feuilles sont alternées et composées de trois folioles rattachées à la tige par un pétiole trifoliées.

Au cours de son développement la première tige croît en produisant des feuilles alternées. Les feuilles sont en général de type trifoliées mais il existe des feuilles multi foliées 4, 5, 6, ... voire de 7 folioles portées sur un pétiole.

Stade 4 : Un bourgeon axillaire de la première feuille unifoliée se développe pour donner une tige secondaire.

Deux autres tiges secondaires démarrent à sa suite depuis le niveau de cotylédons. Les luzernes pérennes de type non dormant produisent plus de tiges secondaires à partir du niveau des cotylédons que le type dormant dont la croissance est stoppée en hiver. C'est l'ensemble de tiges qui vont former le collet.

Stade 5 : Le développement des tiges ; on distingue des tiges primaires, secondaires et tertiaires.

Stade 6 : Floraison, maturité.

II.6. Importance du genre *Medicago*

Etant une source très riche en protéines végétales pour l'alimentation animale et humaine et ne nécessitant pas d'engrais azotés, la luzerne est l'une des plantes les plus cultivées au monde avec 32 millions d'hectares (Michaud et al., 1988). L'utilisation la plus ingénieuse s'illustre dans le modèle australien où l'ensemble des espèces annuelles du genre *Medicago* cultivées constituent la base du système de production du mouton. Ces espèces repérées empiriquement, les agriculteurs se sont dirigés vers la rotation céréales-luzernes afin de remplacer la jachère classique moins productive (Prosperi et al., 1995). Dans

le domaine de la recherche fondamentale *M. truncatula* a déjà fait l'objet de nombreux travaux de biologie moléculaire, qui ont permis d'identifier et d'étudier plusieurs dizaines de gènes impliqués entre autre dans l'interaction symbiotique avec *Sino rhizobium* (Pawlowski, 1997 ; Schultze et Kondorosi, 1998) ou dans la symbiose endomycorhizienne (Harrison, 1999). Il semblerait que *M. Sativa* soit une plante inégalable pour les opérations de Transgénèse visant à lui faire produire des protéines médicamenteuses. Il suffit pour cela de lui transférer le gène désiré ; des essais avaient été faits avec des bactéries, le maïs ou le tabac mais les protéines fabriquées par la luzerne sont beaucoup plus compatibles avec le métabolisme humain. Un champ d'expérimentation immense s'ouvre donc avec l'utilisation de *M. sativa* transgénique (Schoutteten, 2004 ; Moulai, 2009).

II.7. Les espèces spontanées rencontrées en Algérie

Selon le tableau 1, Le genre *Medicago* est représenté en Algérie par de nombreuses espèces annuelles et pérennes (Hireche, 2006).

Tableau 1. Les espèces spontanées du genre *Medicago* rencontrées en Algérie.

Espèces	Caractéristique et air de répartition en Algérie
<i>M. sativa</i>	Plante vivace rencontré un peu partout
<i>M. falcata</i>	Plante vivace très résistante au froid
<i>M. lupulina</i>	Dite lupuline ou minette : plante annuelle ou bisannuelle
<i>M. scundiflora</i>	Plante annuelle ou bisannuelle
<i>M. marina</i>	Plante vivace, elle pousse sur les sables maritimes
<i>M. scutellata</i>	Dite luzerne à écusson : plante annuelle, se rencontre sur les sols argileux du tell
<i>M. orbicularis</i>	Plante annuelle du pâturage de tell
<i>M. echuris</i>	Rencontré surtout dans les pâturages et prairies du tell à sol semi salin
<i>M. ciliaris</i>	Plante annuelle très commune dans le tell
<i>M. truncatula</i>	Plante annuelle, elle est abonde sur les dunes et les littoral et de l'intérieur elles constituent des pâturages de bonne qualité
<i>M. littoralis</i>	Plante annuelle comme dans tout le territoire algérien
<i>M. murex</i>	Plante annuelle, est souvent rencontré sur les sols pauvres.
<i>M. minima</i>	Plante annuelle.
<i>M. arabica</i>	Plante annuelle.
<i>M. lanciniata</i>	Plante annuelle.
<i>M. hispida</i>	Plante annuelle.

III. Les espèces étudiées

III.1. *Medicago truncatula*

C'est une espèce diploïde ($2n=16$) et autogame de taille intermédiaire (60 cm au maximum), poilue, a part variable, souvent prostrée sur des sols lourds ou argileux. l'inflorescence porte de 1 à 5 fleurs de 5 à 8 mm de longueur, présente des gousses de 3 à 12 graines cylindriques en forme de tronc, glabre, très dures, a spires jointives et serrées, aux épines recourbées, souvent perpendiculaires au plan de spires (Fig. 5). Le poids de 1000 graines varie de 3,3 à 6 g. Les fleurs contiennent 10 ovules chacune s'ouvrent seulement après l'auto pollen pour fertiliser les ovules (Lesins and Lesins, 1979).

Cette espèce est localisée principalement dans les régions chaudes et de basse altitude méditerranéennes, elle est considérée comme une espèce assez sensible au froid et aux parasites foliaires. Elle est considérée comme une plante modèle (à un moindre degré que *M. sativa*) essentiellement lors des études sur la symbiose plante-rhizobium (Prosperi, 1995).

III.2. *Medicago ciliaris*

C'est une Plante annuelle de 20-50 cm, couchée, presque glabre. Caractérisée par des folioles obovales, dentées dans le haut et des stipules incisées ou laciniées. Ses fleurs sont jaunes, assez petites (5-7 mm), et en nombre de 1 à 3 sur des pédoncules aristés plus courts que la feuille. Ses gousses sont pubescentes-glanduleuses, arrondies aux deux bouts, à faces planes, à 6-10 tours de spire peu serrés, hérissés d'épines rapprochées, étalées et entrecroisées (Fig. 6). Ses graines sont grandes, oblongues en rein. En région Méditerranéenne, cette espèce est localisée dans l'Europe, de l'Asie, de l'Afrique (Cherifi, 1996).

III.3. *Medicago orbicularis*

La luzerne orbiculaire (*Medicago orbicularis*) est une plante herbacée annuelle de 20 à 60 cm, couchée, presque glabre, à petites fleurs jaunes, qu'on rencontre dans les régions Méditerranéennes. Elle pousse à proximité des cultures (oliviers notamment), et se distingue des autres luzernes par ses stipules profondément échancrées et par ses gousses de 15 mm, en forme de disque à 4-6 spirales aplaties ne portant pas d'épines (Fig. 7) (Yahia et al., 2003).

III.4. *Medicago murex*

Medicago murex ou épineux medick est une espèce de plante du genre *Medicago*. Il se trouve dans tout le bassin méditerranéen. Comme pour toutes les luzernes, leur identification se fait principalement sur les fruits. Ceux de cette espèce sont enroulés en spires jointives,

formant un fruit sub-sphérique (sans face plane aux extrémités), garni d'aiguillons courts et droits (Fig. 8). Ses Fleurs sont peu nombreuses, i.e. une ou deux par pédicelle (Yahia et *al.*, 2003).

III.5. *Medicago rigidula*

Medicago rigidula ou la luzerne de Gérard est une plante herbacée annuelle ou bisannuelle de 10 à 50 cm de hauteur, qui se trouve en Europe, Asie occidentale, Afrique septentrionale. Caractérisée par des fleurs jaunes et des gousses pubescentes (Fig. 9), discoïde-subcylindrique ou en barillet, de 4 à 6 tours de spire serrés, munis d'épines écartées, étalées, coniques et crochues (Abdelguerfi et *al.*, 2003).

IV. Polymorphisme et marqueurs génétiques

On utilise le terme polymorphisme pour désigner l'existence d'une variation discontinue (chaque type étant une morphé) au sein d'une population (Harry, 2001). À l'intérieur d'une population les individus ont un génotype légèrement différent. Ce polymorphisme génétique peut être quantifié sous forme de fréquences alléliques qui sont variables d'une population à l'autre et peuvent évoluer dans le temps (L'évêque et Mounoulou, 2001).

On appelle un marqueur génétique tout marqueur biochimique, chromosomique ou moléculaire qui permet de révéler un polymorphisme. L'identification de formes de polymorphismes dans les espèces peut aider à comprendre leurs distributions et leur évolution historique et aussi bien leur mécanisme d'interaction et leurs coévolutions avec les autres espèces (De Moraes et *al.*, 2007).

IV.1. Les marqueurs moléculaires

Les marqueurs moléculaires correspondent à des différences nucléotidiques existant au niveau de la molécule d'ADN (d'où le terme moléculaire), des techniques de biologie moléculaire permettent de révéler ce polymorphisme de séquences. Ces différences entre allèles peuvent correspondre à des mutations ponctuelles (substitution, insertion, délétion), des réarrangements chromosomiques, ou des mutations silencieuses (sans effet sur l'expression du locus). Les caractères génétiques des marqueurs moléculaires ce sont qu'ils révèlent directement la nature génétique de l'information. Ceci les différencie des caractères morphologiques, physiologiques, et plus généralement de tous les caractères phénotypiques, dus à une addition d'effets génétiques et non génétiques. Cet aspect génétique leur confère un avantage du point de vue de la reconstruction de la phylogénie, par rapport aux caractères classiques utilisés en systématique.

IV.2. Les marqueurs biochimiques

Les marqueurs biochimiques (protéines, iso enzymes...) sont des éléments génétiques issus de l'expression biochimique des gènes, apparus vers 1970, et sont déterminés non seulement par les gènes mais souvent par l'état de développement physiologique ainsi que par l'organe et le milieu où il se trouve (Mansona, 2004).

Les marqueurs biochimiques sont donc des moyens d'étude de facteurs génétiques et non génétiques parce qu'ils permettent de détecter l'influence de l'environnement et du milieu sur le génotype et aident donc à mieux différencier les populations.

IV.2.1. Les marqueurs enzymatiques

Les marqueurs iso enzymatiques (nommés ainsi par market et moller, 1959) définissent un polymorphisme de nature biochimique associée aux différentes formes alléliques d'une même enzyme. Chez plusieurs espèces cultivées, plusieurs marqueurs iso enzymatiques ont contribué à l'élaboration des cartes génétiques (Marchand, 1999).

Le terme iso enzyme englobe les multiples formes moléculaires d'une enzyme donnée, catalysant toutes la même réaction. Ces protéines des formes, des masses moléculaires ou de points isoélectriques différents, résultent des variations dans la composition en acides aminés qui dépend elle-même de la séquence des nucléotides de leurs gènes respectifs. Par conséquent leur mobilité électrophorétique est différente (Al Aoufir, 2001).

IV.2.2. Les marqueurs protéiques

Les protéines consistent en un mélange complexe des protéines extractibles (variable selon le protocole suivi) présente au moment du prélèvement dans les tissus analysés (Prat et *al.*, 2006). La séparation électrophorétique des protéines solubles est largement exploitée pour mettre en évidence les polypeptides caractéristiques d'un individu (Riousset, 2001) l'analyse de leur polymorphisme a constitué une nouvelle approche dans la classification des individus et par là dans l'identification et la différenciation des organismes (Prat et *al.*, 2006).

Les protéines de réserve représentent un outil macromoléculaire d'une haute importance, en effet sont utilisées comme marqueurs biochimiques, en biotechnologie végétale permettant ainsi : l'identification des variétés et des espèces végétales, l'étude de la variabilité et du polymorphisme génétique inter et intra spécifique, l'étude des protéines donne un accès direct vers la génomique, ce qui permet de cibler les molécules et les gènes d'intérêt.

V. Les globulines

Représentent 60 à 90 % de l'azote totale des légumineuses, leur composition en acide aminés soufrés et leur teneur en arginine est faible, elles ont une structure spatiale complexe et peuvent se lier ou se dissocier selon les conditions du milieu.

Chez les légumineuses, la fraction des globulines est déterminée essentiellement par les légumines, les vicillines, convicillines et les lectines.

- Les légumines sont des molécules hexamériques 350 à 410 KDa, elles sont composées de 6 sous unités bi caténares de 60 KDa.
- Les vicillines sont des protéines trimériques dont la masse varie entre 150 et 200 KDa.
- Les convicillines présentent une structure tétramérique et leurs polypeptides constitutifs ont une masse d'environ 280 KDa, la forme finale de la protéine à une masse d'environ de 750 KDa.
- Les lectines, sont des protéines toxiques qui se lient de façon irréversible aux glycoprotéines, ils considérés comme d'excellents outils macromoléculaires, ce sont des protéines de défense contre les insectes et les herbivores et possèdent donc des propriétés insecticides.

Cette partie est consacrée à la description du matériel végétal utilisé dans la présente étude ainsi que les techniques adoptées.

I. Matériel végétal

Notre étude est menée sur des graines matures de 81 accessions de cinq espèces du genre *Medicago* L. : *M. truncatula* (29 accessions), *M. ciliaris* (19 accessions), *M. orbicularis* (18 accessions), *M. murex* (12 accessions) et *M. rigidula* (3 accessions). Ces accessions ont été collectées dans 36 sites géographiques du Nord Algérien (Fig. 10) dans la période Mai à Juillet 2013 par M^{elle} Medoukali I. dans le cadre de sa thèse de Doctorat. Cette collection a pour avantage le fait que les sites prospectés présentent différents climats et subissent des contraintes abiotiques diverses (Tableau 2).



Fig. 10. Localités géographiques des cinq espèces du genre *Medicago* L. collectées dans le Nord Algérien.

II. Méthodes d'étude

II.1. Extraction séquentielle des globulines

Différents protocoles expérimentaux ont été pratiqués pour procéder à l'extraction de la fraction globulines à partir de chaque échantillon. La mise au point du protocole d'extraction a été réalisée selon la technique établie par (Franco et *al.*, 1997) et modifiée au niveau de notre laboratoire. Cette procédure est décomposée en plusieurs étapes décrites ci-dessous :

Tableau 2. Sites de collecte et leurs paramètres bioclimatiques des cinq espèces utilisées dans cette étude.

N°	Sites de collecte	Espèces	ALT	Pm	Tm	TM
1	Oued Athmenia/Mila	3 (<i>M. truncatula</i> , <i>M. ciliaris</i> , <i>M. orbicularis</i>)	757	568	2,5	31,3
2	Bab Trouche/Mila	3(<i>M. truncatula</i> , <i>M. murex</i> , <i>M. ciliaris</i>)	831	742	4,4	31,1
3	Beni Hemiden/Cne	3 (<i>M. truncatula</i> , <i>M. ciliaris</i> , <i>M. orbicularis</i>)	429	704	3,2	31,4
4	Chettaba/Cne	4 (<i>M. truncatula</i> , <i>M. orbicularis</i> , <i>M. murex</i> , <i>M. orbicularis</i>)	850	558	3	32,2
5	Chaabet ersas/Cne	4 (<i>M. truncatula</i> , <i>M. ciliaris</i> , <i>M. orbicularis</i> , <i>M. ciliaris</i>)	584	624	3,3	32
6	Oum Bouaghi	1 (<i>M. tuncatula</i>)	883	462	0,4	31,3
7	Ouled Hemla/OEB	1 (<i>M. truncatula</i>)	795	454	1,9	31,7
8	Ain Fakroun/OEB	2 (<i>M. truncatula</i> , <i>M. orbicularis</i>)	1010	492	0,4	30,8
9	Tipaza	2 (<i>M. truncatula</i> , <i>M. orbicularis</i>)	196	626	8,4	30,1
10	Bourdj bouariridj	3 (<i>M. truncatula</i> , <i>M. orbicularis</i> , <i>M.rigidula</i>)	907	368	1,6	33,4
11	mansoura/BBA	2 (<i>M. truncatula</i> , <i>M. rigidula</i>)	504	409	3,1	32,6
12	lac ain zada/BBA	2 (<i>M. truncatula</i> , <i>M. rigidula</i>)	997	495	0,2	31,1
13	Achir/BBA	1 (<i>M. truncatula</i>)	984	420	1,2	33,1
14	Sidi Belabbes	2 (<i>M. orbicularis</i> , <i>M. ciliaris</i>)	465	450	4,8	29,7
15	Bouira	3 (<i>M. truncatula</i> , <i>M. orbicularis</i> , <i>M. murex</i>)	537	506	0,2	30,9
16	Akhalaria/Bouira	2 (<i>M. truncatula</i> , <i>M. ciliaris</i>)	144	711	5,9	31,9
17	El madania/Alger	1(<i>M. ciliaris</i>)	120	707	8,1	28,5
18	Mohamadia/Alger	3(<i>M. truncatula</i> , <i>M. ciliaris</i> , <i>M. orbicularis</i>)	3	670	7,6	29,8
19	Ben Aknoun/Alger	2 (<i>M. truncatula</i> , <i>M. murex</i>)	172	762	6,9	28,4
20	Blida	3 (<i>M. truncatula</i> , <i>M. orbicularis</i> , <i>M. ciliaris</i>)	70	791	7	30,9
21	Khemis Meliana/ADF	2(<i>M. truncatula</i> , <i>M. ciliaris</i>)	396	593	6	33,5
22	Ain Defla 2	3 (<i>M. truncatula</i> , <i>M. ciliaris</i> , <i>M. murex</i>)	257	593	6	33,5
23	Ain Defla 3	1 (<i>M. ciliaris</i>)	382	593	6	33,5
24	Relizane	1 (<i>M. ciliaris</i>)	58	348	6,8	31,1
25	Chlef	3 (<i>M. truncatula</i> , <i>M. ciliaris</i> , <i>M. murex</i>)	135	405	6,6	32,6
26	Mascara	2 (<i>M. truncatula</i> , <i>M. ciliaris</i>)	281	368	7,5	29
27	Medea	4 (<i>M. truncatulat</i> , <i>M. orbicularis</i> , <i>M. murex</i> , <i>M. ciliaris</i>)	385	736	2,5	30,6
28	Tissemsilt	3 (<i>M. truncatula</i> , <i>M. ciliaris</i> , <i>M. murex</i>)	575	609	1,1	30,1
29	Guelma	4 (<i>M. truncatula</i> , <i>M. orbicularis</i> , <i>M.ciliaris</i> , <i>M. murex</i>)	798	564	1,9	32,1
30	Annaba	2 (<i>M. orbicularis</i> , <i>M. murex</i>)	132	712	8,2	28,1
31	Akbou/Béjaia	2 (<i>M. ciliaris</i> , <i>M. murex</i>)	207	659	6,2	31,3
32	Sétif 1	2 (<i>M. truncatula</i> , <i>M. orbicularis</i>)	1022	482	1	31,3
33	Sétif 2	1 (<i>M. truncatula</i>)	1089	473	0,3	31,7
34	Fesdis/Batna	2 (<i>M. orbicularis</i> , <i>M. truncatula</i>)	946	335	0,7	32,6
35	Boughdir/Jijel	1 (<i>M. orbicularis</i>)	132	818	8,2	29,3
36	Oran	1 (<i>M. truncatula</i>)	87	383	8,2	26,6

Alt – Altitude ; Lat – Latitude ; Lon – Longitude ; Pm– La pluviométrie moyenne ; m– La température minimale du mois le plus froid ; M– La température maximale du mois le plus chaud.

II.1.1. Préparation des échantillons

La procédure appliquée consiste à extraire séquentiellement les protéines dans un échantillon de graines finement broyé à l'aide d'un mortier. La farine obtenue a été récupérée dans des tubes d'ependorf (l'équivalent de 10 mg de farine par tube).

II.1.2. Délipidation de la farine

10 mg de farine contenue dans des tubes d'ependorf sont mélangés à environ 300 μ l de *n*-hexane. Après 30 min d'agitation à température ambiante ce mélange est centrifugé, le *n*-hexane contenant dans le surnageant est évacué et décanté et le culot est séché.

II.1.3. Elimination des Albumines

Le résidu de délipidation est mélangé avec 250 μ l d'une solution d'eau distillée, pH 8, contenant 10 mM CaCl₂, 10 mM MgCl₂ et 1 mM PMSF et agité pendant 30 min à 4°C avant d'être centrifugé à vitesse maximale pendant 20 min à 4°C. Le culot de centrifugation est soumis deux fois à l'extraction comme précédemment. Le surnageant contenant les albumines est éliminé.

II.1.4. Extraction des globulines

Le résidu d'extraction des globulines est mélangé avec 250 μ l d'une solution 0.1 M Tris-HCl, pH8, contenant 10 % (w/v) NaCl, 10 mM EDTA, 10 mM EGTA et 1 mM PMSF. Le mélange est agité 30 min à 4°C puis centrifugé à vitesse maximale pendant 20 min à 4°C. Le surnageant est récupéré comme solution contenant la fraction globulines.

II.1.5. Préparation des extraits pour l'électrophorèse

Les globulines extraites ont été précipités en y ajoutant de l'acétone froide. Après 1 heure de contact à -20°C, les protéines précipitées ont été séparées du surnageant par centrifugation à 10 000 rpm pendant 15 min puis portées à 37°C pendant 15 min. Les culots protéiques ont été mis en suspension dans 100 μ l de tampon de charge Tris-HCl pH 6.8 contenant 2% SDS, 40% glycérol, 0.02% bleu de bromophénol. Les échantillons ont été agités brièvement avant d'être incubés à 65°C pendant 30 min pour permettre la complexion du SDS et soumis à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) à raison de 15 μ l par puits.

II.2. Technique d'électrophorèse

La technique d'électrophorèse utilisée est celle proposée par Laemmli (1970) modifiée par Singh et al. (1991). La séparation se fait sur gel vertical en système discontinu, dans des

conditions dénaturantes (présence de l'agent anionique SDS) non réductrices (absence d'agents réducteurs).

II.2.1. Principe

L'électrophorèse est une technique connue depuis 1930, permettant la séparation des constituants d'un mélange protéiques ou l'action d'un champ électrique. Elle utilise le caractère amphotère des protéines du a la présence des radicales amines et carboxyliques dans la molécule. A pH supérieur à leur pHi moyen (pH en général 8,2 à 8,6), les protéines sont toutes chargées négativement et se comportent comme des anions par suite de l'ionisation des groupements carboxyliques des AA dicarboxyliques (glutamine et acide aspartique). Sous l'action d'un champ électrique, elles vont migrer vers l'anode (+). La mobilité des protéines est en fonction de :

- La charge électrophorétique nette de protéines a un pH donné.
- La dimension et la forme des protéines.
- L'intensité du champ électrique (tension aux électrodes, conductibilité du support).
- La taille des mailles du support solide.
- La force ionique du tampon.
- La température de l'électrolyte.

II.2.2. préparation des gels

Les plaques de verre qui servent de moule pour la polymérisation des gels sont nettoyées à l'éthanol. Elles sont ensuite assemblées avec deux espaceurs d'une épaisseur de 1,5mm chacun. Le support d'électrophorèse est formé d'un gel de séparation (separating gel) à $T^1 = 12,58 \%$ et $C^2 = 0,97 \%$, et d'un gel de concentration (stacking gel) à $T = 2,88 \%$ et $C = 1,42 \%$. ces deux gels sont préparés à base d'acrylamide à 40% (p/v), de N,N'-méthylène bis-acrylamide à 2% (p/v) et de Tris-HCL 1M ,tamponnés à pH 8.8 pour le gel de séparation, et à pH 6.8 pour le gel de concentration. Ces deux gels sont polymérisés en présence du TEMED et de l'APS.

Le gel de séparation est préparé le premier, bien mélangé puis coulé entre deux plaques en verre, en laissant un vide de 4 cm pour le stacking gel. Une fine couche du butanol est ajoutée pour niveler le gel et pour le protéger de l'air. La polymérisation s'effectue à une température ambiante pendant environ 45 minutes. Ensuite, le gel de concentration est préparé, bien mélangé puis coulé, et des peignes à 15 puits sont rapidement insérés.

Après la polymérisation du stacking gel qui s'effectue en plus de 60 minutes, les peignes sont enlevés en obtenant ainsi des puits servant pour les dépôts des extraits protéiques, les puits sont remplis avec du tampon avant le dépôt des échantillons.

II.2.3. tampon d'électrophorèse

Après dépôt des échantillons, la cuve d'électrophorèse est remplie avec un volume suffisant de tampon de migration Tris 25 mM pH 8,3 contenant 1.4 % (p/v) de glycine et 0,1% (p/v) de SDS.

II.2.4. conditions de migration

La température de la cuve est maintenue aux environs de 4°C grâce à un système de refroidissement qui lui est raccordé. Pour une cuve de deux gels de 180 x 160 x 1,5mm de dimension chacun, la migration est menée à une intensité de courant de 80 mA avec une tension maximale de 1200 V.

II.2.5. fixation, coloration et décoloration

Après la sortie du front de migration, le gel de concentration est éliminé, les gels sont démoulés et mis dans des bacs contenant une solution composée d'un agent fixateur des protéines, le TCA (acide trichloracétique) à 60 %, ainsi qu'un produit colorant, le bleu de Coomassie R-250. Les bacs sont mis en agitation pendant 24 heures. Les gels sont ensuite décolorés à l'eau de robinet.

II.3. Analyse des données

Les profils électrophorétiques sont comparés après lecture de la mobilité des bandes obtenues. Toutes les analyses reposent sur la matrice de présence (1) absence (0) des bandes des globulines. Les différents échantillons étudiés sont comparés par pair et les distances génétiques ont été calculées en utilisant la distance Euclidienne qui peut se calculer comme suit :

$$D^2(i,j) = \sum M_{ab} (X_{ia} - X_{ja}) (X_{ib} - X_{jb})$$

Avec X_{ia} = valeur de la variable a pour l'individu i

Et M_{ab} = coefficient de pondération de l'interaction des variables a et b

A partir des distances génétiques calculées, une classification hiérarchique en UPGMA (*unweighted pair group method arithmetic average*) a été élaborée moyennant le logiciel Statistica version 6.0.

Notre travail consiste à l'étude de la diversité génétique de la fraction des globulines chez cinq espèces du genre *Medicago*. Pour cela nous avons utilisé la technique d'électrophorèse en conditions dénaturantes non réductrices (SDS-PAGE) décrite par Laemmli (1970) modifié par Singh et *al.* (1991)

I. Fractionnement des Globulines et lecture des profils électrophorétiques

Cette technique nous a permis de détecter des différences dans la fraction globulines entre les accessions et les espèces du genre *Medicago*. Les bandes sont très bien séparées avec une bonne résolution et elles révèlent un polymorphisme entre les espèces.

La figure 11, montre le profil électrophorétique obtenu habituellement quand la migration est arrêtée au moment où le front de bleu de bromophénol atteint la limite du gel. Le diagramme se décompose en trois principales zones de mobilité décroissante A, B et C.

- **Zone (A)** : C'est la zone lente, comprend les bandes qui ont un poids moléculaire supérieure ou égale à 100 kDa, les bandes dans cette zone sont bien séparées et ont des intensités différentes.
- **Zone (B)** : C'est la zone intermédiaire, contient des bandes avec un poids moléculaire s'étend de 25 à 100 KDa. Elle est caractérisée par une considérable variabilité des profils tant pour le nombre que pour l'intensité des électromorphes. La majeure partie des globulines est localisée dans cette zone de mobilité.
- **Zone (C)** : C'est la zone rapide, contient des globulines très peu variables avec un poids moléculaire moins de 25 KDa

Ces 3 zones sont caractérisées par les gammes de mobilité suivantes :

$$5\text{mm} < \text{Zone A} < 40\text{mm}$$

$$42\text{mm} < \text{Zone B} < 108\text{mm}$$

$$114\text{mm} < \text{Zone C} < 165\text{mm}$$

La lecture des diagrammes consiste à relever la mobilité (mm) de chacune des bandes présentes en mesurant la distance parcourue par chaque bande dans le gel de séparation. La mobilité d'une bande est la distance entre le point d'application de l'échantillon et la position de la bande correspondante dans le gel. A cet effet, nous avons utilisé une accession de référence qui a servi de repère pour tenir compte des variations de mobilité observées entre les gels.

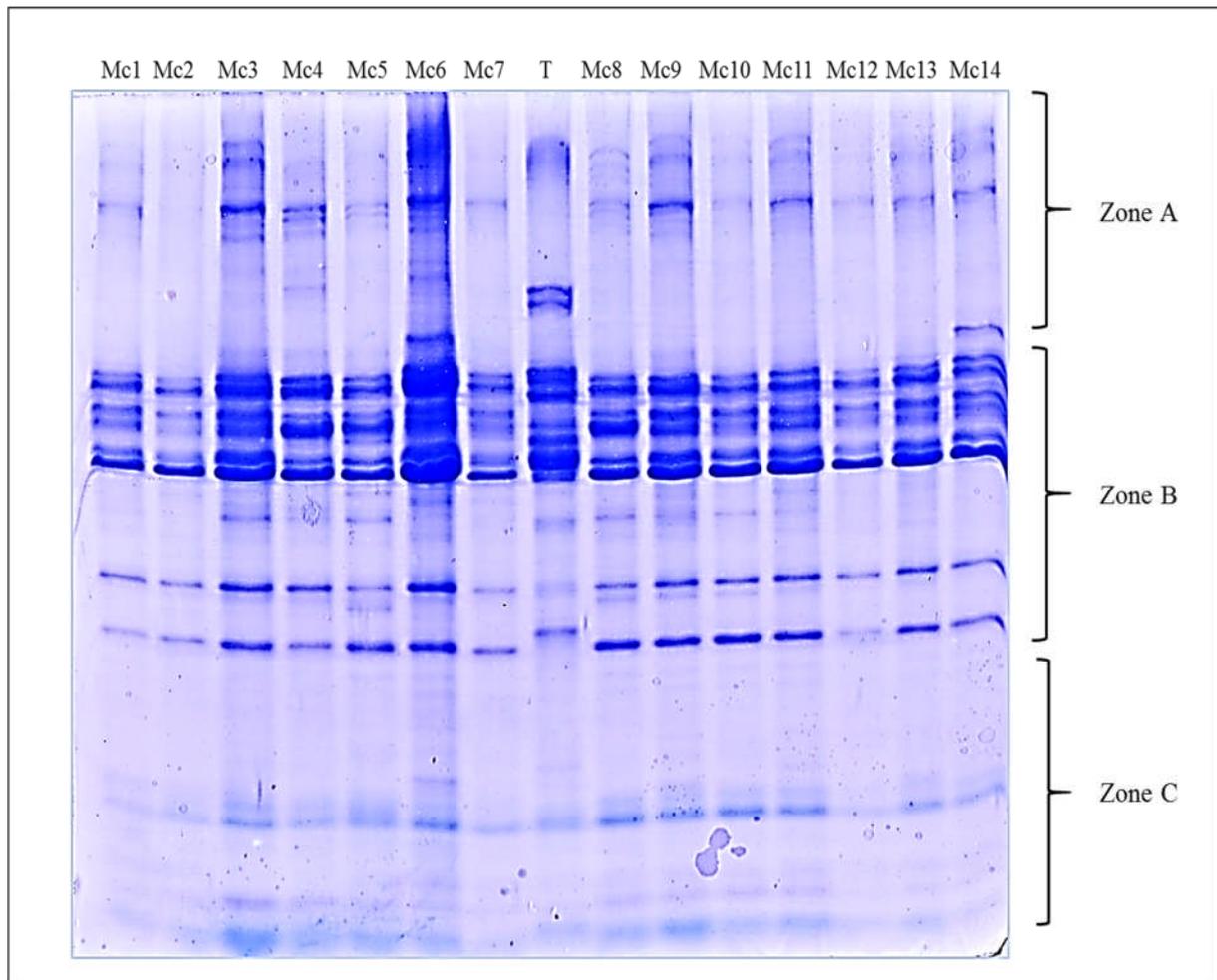


Fig. 11. Exemple de profils électrophorétiques des globulines obtenus par SDS-PAGE dans les conditions dénaturantes non réductrices chez *M. ciliaris*.

II. Analyse de la diversité génétique des populations Algériennes du genre *Medicago*

L'analyse des diagrammes électrophorétiques met en évidence des différences inter et intra-spécifiques. L'ensemble des mobilités relatives des bandes dans huit gels ont été exploité pour l'établissement des matrices fondées sur un caractère qualitatif (présence (1) et absence (0) de toutes les bandes examinées). Ces matrices représentent les configurations des globulines et permettent de conserver une image réelle des gels. Elles peuvent aussi servir comme base de données pour l'établissement d'un catalogue et ont de ce fait une application directe dans l'identification.

La variabilité des globulines a été analysée en reportant sur la matrice de présence et absence des bandes. Leur fréquence a été calculée à travers toutes les accessions de la collection et également dans chaque espèce. Les distances Euclidiennes ont été calculées et un dendrogramme a été construit selon la méthode agrégative UPGMA. Des matrices de distances génétiques entre les espèces et les accessions ont été élaborées.

II.1. Polymorphisme interspécifique

L'étude inter-spécifique a porté sur les cinq espèces de luzerne ; *M. truncatula*, *M. ciliaris*, *M. orbicularis*, *M. murex* et *M. rigidula*. Chaque espèce a été représentée par l'ensemble de ses accessions. Pour estimer la variation des globulines entre les espèces, les bandes ont été analysés comme caractéristiques binaires en mettant en commun les diagrammes pour les différentes espèces, i.e., toute bande présente dans quelques ou toutes les accessions d'une espèce a été considérée comme une bande présente pour cette espèce.

II.1.1. Fréquences des globulines

En somme, les zones de mobilités ont engendré 70 bandes que nous avons numérotées de la bande la plus lente à la bande la plus rapide. La fréquence des 70 globulines détectées dans les 81 accessions des cinq espèces du genre *Medicago* est donnée dans le tableau 3.

Trois bandes (B39, B31 et B36) ont des fréquences relativement élevées (> 0.65) avec les valeurs 0.80, 0.74 et 0.65, respectivement. Ce qui montre leur dominance dans la zone B, et par conséquent, ce sont des bons marqueurs pour la comparaison des gels. Des fréquences moyennes ont été également notées, elles varient de 0.47 à 0.58, parmi eux nous trouvons les bandes B56 et B70 dont les fréquences sont respectivement, 0.47 et 0.58. La plus faible fréquence (0.01) a été observée dans trois bandes (B8, B13, B49) qui sont présentes chacune dans une seule accession uniquement. Suivie par la fréquence 0.02 notée pour la bande B18

qui a été partagé par deux accessions appartenant aux deux espèces *M. truncatula* et *M. ciliaris*.

Tableau 3. Fréquences des globulines dans les cinq espèces du genre *Medicago* L.

Globulines	N	Fréquence	Globulines	N	Fréquence	Globulines	N	Fréquence
B1	18	0,22	B25	6	0,07	B49	1	0,01
B2	8	0,10	B26	9	0,11	B50	19	0,23
B3	17	0,21	B27	13	0,16	B51	20	0,25
B4	4	0,05	B28	3	0,04	B52	4	0,05
B5	22	0,27	B29	6	0,07	B53	21	0,26
B6	19	0,23	B30	7	0,09	B54	22	0,27
B7	15	0,19	B31	60	0,74	B55	43	0,53
B8	1	0,01	B32	31	0,38	B56	38	0,47
B9	9	0,11	B33	31	0,38	B57	36	0,44
B10	22	0,27	B34	17	0,21	B58	6	0,07
B11	3	0,04	B35	12	0,15	B59	21	0,26
B12	3	0,04	B36	53	0,65	B60	4	0,05
B13	1	0,01	B37	37	0,46	B61	9	0,11
B14	21	0,26	B38	31	0,38	B62	34	0,42
B15	13	0,16	B39	65	0,80	B63	28	0,35
B16	8	0,10	B40	35	0,43	B64	29	0,36
B17	8	0,10	B41	33	0,41	B65	21	0,26
B18	2	0,02	B42	22	0,27	B66	27	0,33
B19	3	0,04	B43	34	0,42	B67	31	0,38
B20	8	0,10	B44	35	0,43	B68	18	0,22
B21	26	0,32	B45	32	0,40	B69	25	0,31
B22	26	0,32	B46	14	0,17	B70	47	0,58
B23	3	0,04	B47	15	0,19			
B24	20	0,25	B48	15	0,19			
Nombre d'individus	81			81			81	

II.1.2. Distances génétiques

Les distances génétiques entre les cinq espèces étudiées ont été calculées sur la base des Données des globulines et en utilisant la distance Euclidienne. Les résultats figurent dans le tableau 4. Les valeurs obtenues traduisent une dissimilarité relative entre les espèces étudiées,

elles varient entre 5.10 et 6.32. La distance la plus faible (5.10) a été notée entre *M. truncatula* et *M. murex* suivi par *M. truncatula* et *M.rigidula* avec une distance de 5.57. Aussi, la distance la plus élevée (6.32) a été obtenue entre *M. rigidula* et *M. orbicularis*. Des distances intermédiaires ont été enregistrées pour d'autres couples d'espèces comme c'est montré dans le tableau.

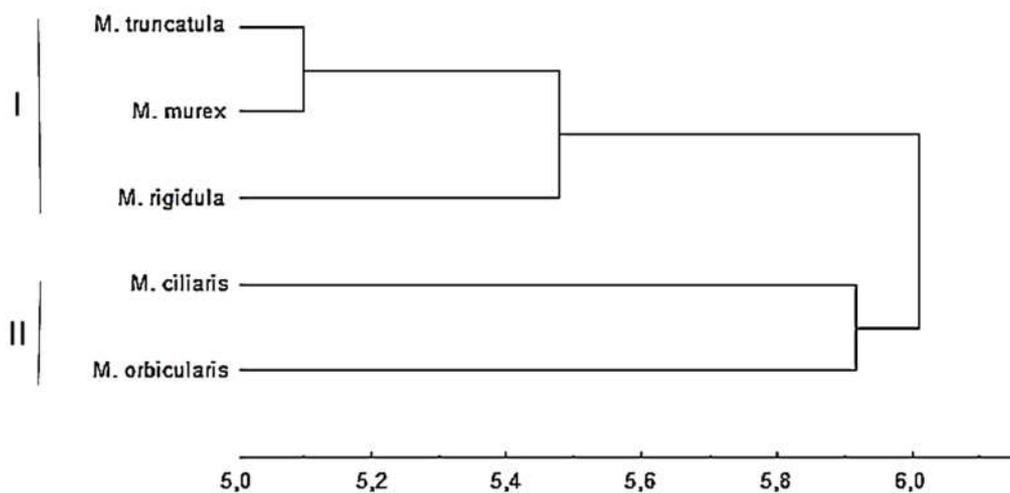
	<i>M. truncatula</i>	<i>M. ciliaris</i>	<i>M. orbicularis</i>	<i>M. rigidula</i>	<i>M. murex</i>
<i>M. truncatula</i>	0,00	6,00	5,92	5,57	5,10
<i>M. ciliaris</i>		0,00	5,92	6,08	6,00
<i>M. orbicularis</i>			0,00	6,32	5,74
<i>M. rigidula</i>				0,00	5,39
<i>M. murex</i>					0,00

Tableau 4. Distances génétiques calculées entre les cinq espèces du genre *Medicago* L.

II.1.3. Classification hiérarchique

Les distances Euclidiennes calculées entre les cinq espèces étudiées ont été utilisées pour construire un dendrogramme en UPGMA (Fig. 12).

Fig. 12. Classification hiérarchique en UPGMA des cinq espèces du genre *Medicago* basée



sur le polymorphisme des globulines.

La classification probable concorde avec les critères taxonomiques, en effet, elle subdivise les espèces en deux groupes majeurs à une distance d=6.01. Le groupe I formé de trois espèces appartenant à la même sous-section (*Pachyspireae* (Urb.) Heyn) de la section *Spirocarpos*

Ser. (Lesins and Lesins, 1979). A un degré plus élevé de similarité ($d=5.47$) nous pouvons définir deux sous-groupes au niveau du groupe I ; L'un est constitué d'une seule espèce (*M. rigidula*) et l'autre des deux espèces *M. truncatula* et *M. murex* qui forment un clade entre elles et présentent les espèces les plus proches avec une distance $d=5.10$. À une distance $d=5.92$, Le groupe II se compose de deux espèces *M. ciliaris* et *M. orbicularis* qui appartiennent à deux sections différentes : *Spirocarpos Ser.* et *Orbiculares Urb.*, respectivement.

II.2. Polymorphisme intra-spécifique

II.2.1. Chez l'espèce *M. truncatula*

L'analyse intra-spécifique de l'espèce *M. truncatula* sur la base des globulines a permis de générer des profils électrophorétiques hétérogènes.

a. Fréquences des globulines

A travers les 29 accessions de cette espèce, 38 bandes ont été obtenues, leurs fréquences sont représentées dans le tableau 5.

Tableau 5. Fréquences des 38 globulines observées chez les accessions de *M. truncatula*

Globulines	N	Fréquence	Globulines	N	Fréquence	Globulines	N	Fréquence
B5	14	0,48	B39	29	1,00	B55	29	1,00
B7	13	0,45	B40	10	0,34	B56	8	0,28
B18	1	0,03	B41	4	0,14	B57	19	0,66
B21	11	0,38	B42	1	0,03	B59	10	0,34
B22	8	0,28	B43	16	0,55	B61	3	0,10
B25	1	0,03	B44	15	0,52	B62	14	0,48
B26	2	0,07	B45	2	0,07	B63	18	0,62
B31	29	1,00	B46	5	0,17	B64	14	0,48
B32	14	0,48	B47	14	0,48	B65	15	0,52
B33	29	1,00	B48	1	0,03	B67	15	0,52
B36	25	0,86	B51	15	0,52	B68	1	0,03
B37	14	0,48	B53	2	0,07	B70	29	1,00
B38	15	0,52	B54	14	0,48			
Nombre d'individus	29			29			29	

D'après le tableau 5, nous avons constaté une grande variabilité de fréquences des globulines dans les accessions de *M. truncatula*. Parmi les 38 bandes détectées, seulement cinq sont monomorphes (B31, B33, B39, B55 et B70), elles sont omniprésentes dans toutes les accessions avec un taux maximum (1.00). Suivies par la bande B36 avec une fréquence

élevée (0.86), cette bande est absente chez quatre accessions seulement. Plusieurs bandes avec des fréquences faibles ont été enregistrées, parmi elles les bandes B18, B25, B42, B48 et B69 sont présentes dans une seule accession chacune avec une fréquence minimale (0.03). Des fréquences intermédiaires pour d'autres bandes ont été également notées comme c'est indiqué dans le tableau.

b. Distances génétiques

Les dissimilarités entre les 29 accessions de *M. truncatula* ont été calculées sur la base des 38 bandes obtenues moyennant la distance Euclidienne (Tableau 6).

Les distances entre les accessions étudiées ont été importantes, les valeurs de la distance Euclidienne variaient entre 0.00 et 4.90. Deux couples d'accessions (Mt1 et Mt8 ; Mt18 et Mt20) sont similaires à 100 % présentant la valeur de distance 0.00. Les accessions les plus proches avec une valeur de distance la moins élevée 1.00 ont été représentées par 14 paires d'accessions dont certaines sont prélevées dans des sites géographiquement proches, exemple ; Mt4 et Mt5 (Ain Defla), Mt1 et Mt2 (Oum El Bouaghi) et Mt12 et Mt13 (Alger). D'autres sont géographiquement éloignées comme Mt2 (Oum El Bouaghi) et Mt6 (Bouira), Mt16 (Bourdj Bouariridj) et Mt23 (Mascara). La distance génétique la plus élevée (4.90) a été obtenue entre Mt27 (Guelma) et les trois accessions Mt3 (Oum El Bouaghi), Mt5 (Ain Defla) et Mt11 (Mila) avec un climat varie de semi-aride au subhumide. Des valeurs intermédiaires à celles-ci ont été obtenues comme résumé dans le tableau 6.

c. Classification hiérarchique

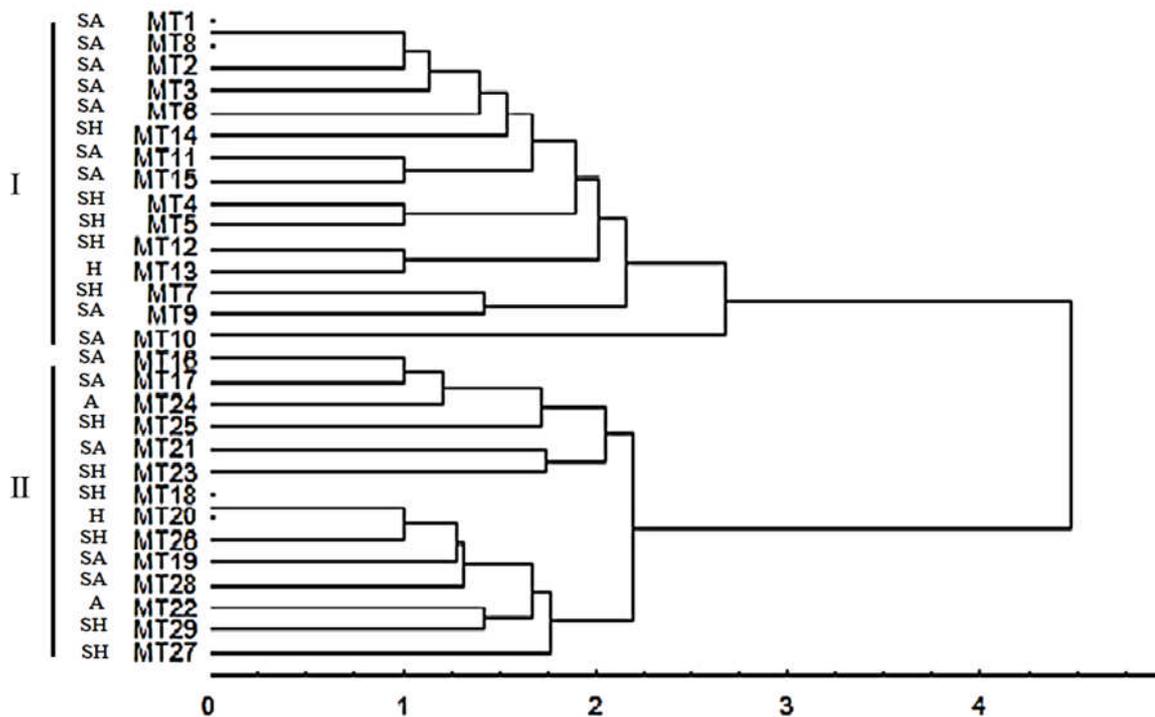
Les distances Euclidiennes calculées entre les 29 accessions de l'espèce *M. truncatula* basées sur le polymorphisme des globulines nous a aidé à élaborer un dendrogramme en UPGMA (Fig. 13).

Le dendrogramme définit deux groupes probable à une distance $d=4.47$. Le groupe I comprend 15 accessions relativement distantes dont les plus proches constituent un clade à une valeur de distance $d=1.00$. À une distance plus faible $d=2.67$, se détache l'accession Mt10 (collectée dans une région semi-aride) des autres accessions qui représentent des régions avec une large gamme des étages bioclimatiques, varie de l'humide (Mt13) au semi-aride. Les deux accessions similaires à 100 % (Mt1 et Mt8) appartiennent à deux régions semi-aride ; Ouled Hamla/ Oum Bouaghi et Chettaba/ Constantine, pour les deux accessions, respectivement. Le groupe II est constitué des accessions un peu plus proches, et est subdivisé lui-même en deux sous-groupes à une distance $d=2.19$. Six accessions appartenant à différents climats (varient du subhumide à l'aride) constitue le sous-groupe II.1, Alors que le sous-groupe II.2 regroupe huit accessions avec un climat varie entre l'humide et le semi-aride.

Tableau 6. Distances génétiques obtenues entre les accessions de *M. truncatula*.

	Mt1	Mt2	Mt3	Mt4	Mt5	Mt6	Mt7	Mt8	Mt9	Mt10	Mt11	Mt12	Mt13	Mt14	Mt15	Mt16	Mt17	Mt18	Mt19	Mt20	Mt21	Mt22	Mt23	Mt24	Mt25	Mt26	Mt27	Mt28	Mt29
Mt1	0,00	1,00	1,00	2,00	1,73	1,41	2,24	0,00	1,73	2,83	1,73	2,24	2,00	1,41	1,41	4,24	4,36	4,47	4,47	4,47	4,47	4,58	4,36	4,36	4,36	4,58	4,80	4,69	4,58
Mt2		0,00	1,41	1,73	1,41	1,00	2,45	1,00	2,00	2,65	2,00	2,00	1,73	1,73	1,73	4,12	4,24	4,36	4,36	4,36	4,36	4,47	4,24	4,24	4,24	4,47	4,69	4,58	4,47
Mt3			0,00	2,24	2,00	1,73	2,45	1,00	2,00	3,00	2,00	2,45	2,24	1,73	1,73	4,36	4,47	4,58	4,58	4,58	4,58	4,69	4,47	4,47	4,47	4,69	4,90	4,80	4,69
Mt4				0,00	1,00	1,41	2,65	2,00	2,24	2,45	1,73	2,24	2,00	2,00	2,00	4,47	4,58	4,47	4,47	4,47	4,47	4,69	4,58	4,58	4,36	4,58	4,80	4,69	4,58
Mt5					0,00	1,73	2,83	1,73	2,45	2,65	2,00	2,45	2,24	2,24	2,24	4,36	4,47	4,58	4,58	4,58	4,58	4,69	4,47	4,47	4,47	4,69	4,90	4,80	4,69
Mt6						0,00	2,24	1,41	1,73	2,45	1,73	1,73	1,41	1,41	1,41	4,24	4,36	4,24	4,24	4,24	4,47	4,36	4,36	4,36	4,12	4,36	4,58	4,47	4,36
Mt7							0,00	2,24	1,41	2,65	2,45	2,45	2,24	2,24	2,24	4,36	4,47	4,36	4,36	4,36	4,58	4,47	4,47	4,47	4,24	4,47	4,69	4,58	4,47
Mt8								0,00	1,73	2,83	1,73	2,24	2,00	1,41	1,41	4,24	4,36	4,47	4,47	4,47	4,47	4,58	4,36	4,36	4,36	4,58	4,80	4,69	4,58
Mt9									0,00	3,00	2,00	2,00	1,73	1,73	1,73	4,36	4,47	4,36	4,36	4,36	4,58	4,47	4,47	4,47	4,24	4,47	4,69	4,58	4,47
Mt10										0,00	2,65	2,65	2,45	2,45	2,83	4,47	4,58	4,24	4,24	4,24	4,24	4,24	4,12	4,36	4,36	4,12	4,12	4,36	4,24
Mt11											0,00	2,00	2,24	1,73	1,00	4,58	4,69	4,58	4,58	4,58	4,58	4,80	4,69	4,69	4,69	4,47	4,69	4,90	4,80
Mt12												0,00	1,00	1,73	1,73	4,36	4,47	4,36	4,36	4,36	4,58	4,47	4,47	4,47	4,24	4,47	4,69	4,58	4,47
Mt13													0,00	1,41	2,00	4,24	4,36	4,24	4,24	4,24	4,47	4,36	4,36	4,36	4,12	4,36	4,58	4,47	4,36
Mt14														0,00	1,41	4,24	4,36	4,24	4,24	4,24	4,47	4,36	4,36	4,36	4,12	4,36	4,58	4,47	4,36
Mt15															0,00	4,47	4,58	4,47	4,47	4,47	4,69	4,58	4,58	4,58	4,36	4,58	4,80	4,69	4,58
Mt16																0,00	1,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,65	1,73	1,00	1,73	2,24	2,24	2,45	2,65
Mt17																	0,00	2,24	2,24	2,24	2,24	2,83	2,00	1,41	2,00	2,45	2,45	2,65	2,83
Mt18																		0,00	1,41	0,00	2,00	1,73	1,73	2,24	2,24	1,00	1,73	1,41	1,73
Mt19																			0,00	1,41	2,00	1,73	2,24	1,73	1,73	1,00	1,73	1,41	1,73
Mt20																				0,00	2,00	1,73	1,73	2,24	2,24	1,00	1,73	1,41	1,73
Mt21																					0,00	1,73	1,73	1,73	2,24	1,73	2,24	2,00	2,24
Mt22																						0,00	2,45	2,45	2,00	1,41	2,00	1,73	1,41
Mt23																							0,00	2,00	2,45	2,00	2,45	2,24	2,45
Mt24																								0,00	1,41	2,00	2,00	2,24	2,45
Mt25																									0,00	2,00	2,00	2,24	2,00
Mt26																										0,00	1,41	1,00	1,41
Mt27																											0,00	1,73	2,00
Mt28																												0,00	1,73
Mt29																													0,00

Fig. 13. Classification hiérarchique en UPGMA des 29 accessions de *M. truncatula* basée sur le polymorphisme des globulines.



II.2.2. Chez l'espèce *M. ciliaris*

L'étude intra-spécifique de *M. ciliaris* sur la base des globulines a porté sur 19 différentes accessions et a permis de générer une hétérogénéité de profils importante.

a. Fréquences des globulines

Les différentes bandes des globulines observées ont été variables d'une accession à une autre. En somme, 52 bandes avec des mobilités et fréquences différentes ont été enregistrées pour cette espèce (Tableau 7).

Une seule bande (B36) a été notée monomorphe, elle est omniprésente avec une fréquence 1.00, ce qui implique sa dominance dans la Zone B. Suivie par cinq bandes considérées fréquentes (B34, B45, B65, B68, B70) et présentes dans 14 accessions avec un pourcentage 74%. La fréquence moyenne (0.58) a été enregistrée dans les deux bandes B53, B56 (présence dans 11 accessions). Les bandes les moins fréquentes sont celles observées dans une seule accession chacune, nous notons les bandes B8, B12, B13, B18, B20, B21, B29, B49 comme très faiblement fréquentes avec un pourcentage minime de 5%. L'espèce *M. ciliaris* a été caractérisée par un certain nombre de marqueurs spécifiques, d'où, parmi les 52 bandes détectées, 7 marqueurs uniques (B4, B8, B11, B13, B23, B49, B52) ont été enregistrés avec des fréquences variables.

Tableau 7. Fréquences des 52 globulines observées chez les accessions de *M. ciliaris*

Globulines	N	Fréquence	Globulines	N	Fréquence	Globulines	N	Fréquence
B2	4	0,21	B21	1	0,05	B49	1	0,05
B3	2	0,11	B23	3	0,16	B50	2	0,11
B4	4	0,21	B24	1	0,05	B52	4	0,21
B5	4	0,21	B25	4	0,21	B53	11	0,58
B6	2	0,11	B26	7	0,37	B55	6	0,32
B7	2	0,11	B27	3	0,16	B56	11	0,58
B8	1	0,05	B29	1	0,05	B57	4	0,21
B9	7	0,37	B34	14	0,74	B58	2	0,11
B10	5	0,26	B35	5	0,26	B60	2	0,11
B11	3	0,16	B36	19	1,00	B61	3	0,16
B12	1	0,05	B38	6	0,32	B62	5	0,26
B13	1	0,05	B39	6	0,32	B64	9	0,47
B14	4	0,21	B40	10	0,53	B65	14	0,74
B15	2	0,11	B42	6	0,32	B67	5	0,26
B16	2	0,11	B43	3	0,16	B68	14	0,74
B17	2	0,11	B44	2	0,11	B70	14	0,74
B18	1	0,05	B45	14	0,74			
B20	1	0,05	B46	5	0,26			
Nombre d'individus	19			19			19	

b. Distances génétiques

La comparaison des 19 accessions a été réalisée sur la base des profils des globulines en utilisant la distance génétique les résultats sont présentés dans le tableau 8.

Les distances entre les différentes accessions ont été très importantes vu les valeurs enregistrées qui variaient entre 0.00 et 5.29. Deux accessions sont similaires à 100 % avec la valeur de distance 0.00 ; Mc 15 (Chlef) et Mc16 (Mascara). Suivies par la distance la plus faible (1.73) entre les deux accessions Mc2 et Mc7 collectées dans des régions géographiquement éloignées (Mila et Bouira, respectivement). Par ailleurs, des valeurs de distance élevées ont été observées dans la plupart des paires d'accessions, dont la plus élevée (5.29) a été notée entre Mc17 (Médéa) et les deux accessions Mc11 (Ain Defla) et Mc14 (Relizane).

Tableau 8. Distances génétiques obtenues entre les accessions de *M. ciliaris*.

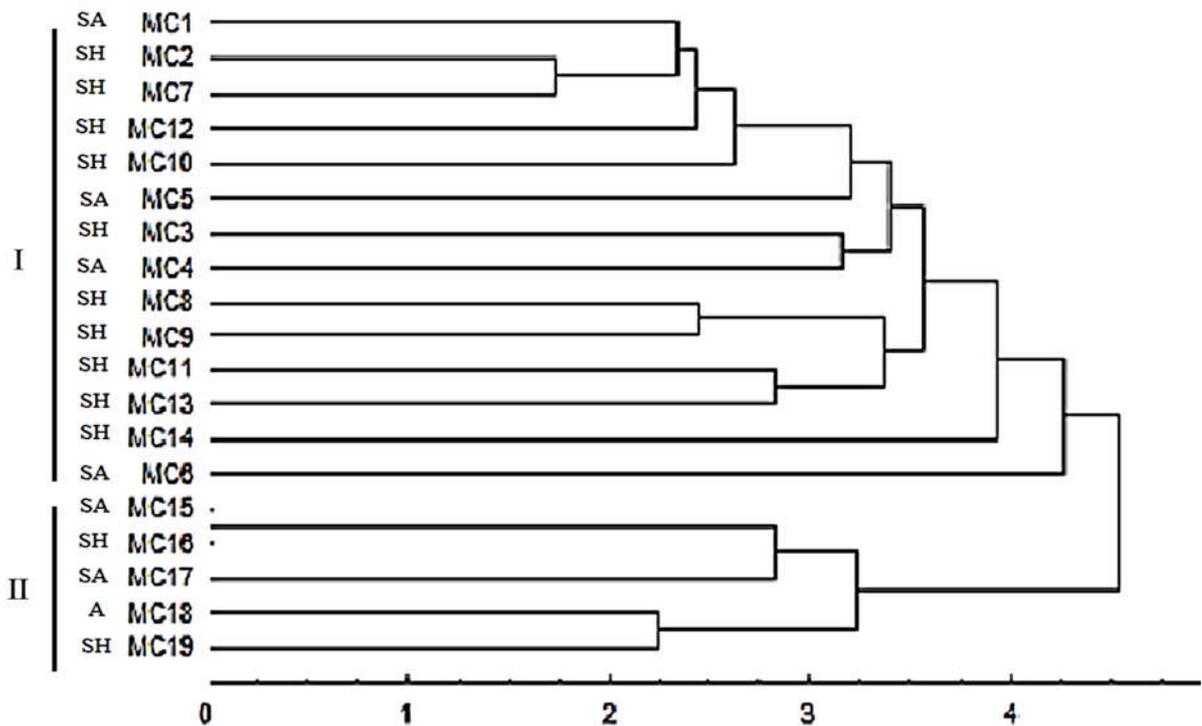
	Mc1	Mc2	Mc3	Mc4	Mc5	Mc6	Mc7	Mc8	Mc9	Mc10	Mc11	Mc12	Mc13	Mc14	Mc15	Mc16	Mc17	Mc18	Mc19	
Mc1	0,00	2,24	2,65	3,00	3,46	4,69	2,45	3,46	3,16	2,83	3,87	2,65	3,61	3,87	4,36	4,36	4,36	4,12	4,69	
Mc2		0,00	3,16	3,16	2,65	4,12	1,73	3,61	3,00	2,24	4,00	2,45	3,46	3,74	3,74	3,74	3,74	3,46	4,12	
Mc3			0,00	3,16	3,61	5,00	3,32	3,61	3,00	3,61	4,00	3,74	4,00	4,24	4,90	4,90	4,90	4,47	4,80	
Mc4				0,00	3,32	4,12	3,61	3,87	3,61	3,61	4,69	4,00	4,24	4,69	4,90	4,90	4,90	4,47	5,00	
Mc5					0,00	4,00	3,16	3,74	3,46	3,16	4,12	3,61	3,61	4,12	4,12	4,12	4,36	3,87	4,24	
Mc6						0,00	4,00	4,00	4,00	3,74	4,36	4,58	3,87	5,00	5,20	5,20	4,80	4,80	5,10	
Mc7							0,00	3,74	3,46	2,45	3,87	2,24	3,00	3,87	3,87	3,87	3,87	3,87	4,47	
Mc8								0,00	2,45	2,83	3,32	4,12	3,61	4,36	5,00	5,00	5,00	4,80	4,90	
Mc9									0,00	2,45	3,00	3,87	3,61	4,12	4,58	4,58	4,58	4,36	4,69	
Mc10										0,00	3,32	3,00	3,32	3,87	4,12	4,12	4,36	4,12	4,47	
Mc11											0,00	3,16	2,83	3,74	4,90	4,90	5,29	4,90	5,20	
Mc12												0,00	2,83	3,46	4,24	4,24	4,47	4,00	4,58	
Mc13													0,00	3,16	4,47	4,47	4,69	4,24	4,58	
Mc14														0,00	4,90	4,90	5,29	4,69	5,00	
Mc15															0,00	0,00	2,83	3,16	3,32	
Mc16																0,00	2,83	3,16	3,32	
Mc17																	0,00	3,16	3,32	
Mc18																		0,00	2,24	
Mc19																				0,00

c. Classification hiérarchique

Les distances génétiques entre les différentes accessions de *M. ciliaris* ont été utilisées pour réaliser une classification hiérarchique en UPGMA (Fig. 14).

La classification probable des 19 accessions de *M. ciliaris* montre le groupement de ces accessions selon leurs similarités en deux classes distinctes à une distance $d=4.53$. La 1^{ère} classe regroupe la majorité des accessions (14 accessions) qui se caractérisent par un climat subhumide, à l'exception de quatre accessions appartenant à des régions avec un climat semi-aride (Mc1, Mc5, Mc4 et Mc6). En outre, la 2^{ème} classe renferme cinq accessions qui appartiennent à des régions représentatives des trois étages climatiques ; subhumide, semi-aride et Aride. Cette classe se subdivise elle-même en deux sous classe à une distance génétique $d=3.23$. À une distance $d=2.82$ la 1^{ère} sous classe se compose de 3 accessions dont les deux accessions Mc15 et Mc16 sont similaire à 100 % bien qu'elles appartiennent à différents climats.

Fig. 14. Classification hiérarchique en UPGMA des 19 accessions de *M. ciliaris* basée sur le polymorphisme des globulines



II.2.3. Chez l'espèce *M. orbicularis*

L'étude intra-spécifique de *M. orbicularis* a porté sur 18 accessions représentatives de tous les étages bioclimatiques. L'analyse des globulines a permis de générer des profils électrophorétiques clairs avec des bandes bien décelées.

a. Fréquences des globulines

Les différentes bandes des globulines observées dans les trois zones des différentes accessions d'espèces *M. orbicularis* sont en nombre de 46 bandes avec des mobilités et fréquences différentes (Tableau 9).

Cinq bandes (B22, B24, B31, B39, B44) ont été marquées monomorphes, elles sont omniprésentes dans toutes les accessions à 100 %. Suivies par des bandes à fréquences moins élevées varient entre 0.72 et 0.94, à titre d'exemple nous citons les bandes B1, B3, B14 et B41. Une fréquence moyenne (50 %) a été notée pour la bande B36 qui a été présente chez 9 accessions parmi les 18. Des fluctuations des globulines dans les différentes accessions de *M. orbicularis* s'apparaissent aux niveaux des bandes qui sont présentes à des faibles fréquences. Les bandes B45, B54, B59, B60 et B61 représentent la plus faible fréquence enregistrée (0.06), elles sont présentes chacune dans une seule accession de *M. orbicularis*. Nous avons

noté deux marqueurs spécifiques à cette espèce (B19 et B28) qui sont présentes tous les deux avec la fréquence 0.03 (chez trois accessions).

Tableau 9. Fréquences des 46 globulines observées chez les accessions de *M. orbicularis*

Globulines	N	Fréquence	Globulines	N	Fréquence	Globulines	N	Fréquence
B1	14	0,78	B30	5	0,28	B51	4	0,22
B2	2	0,11	B31	18	1,00	B54	1	0,06
B3	13	0,72	B32	16	0,89	B56	14	0,78
B6	14	0,78	B34	3	0,17	B57	3	0,17
B9	2	0,11	B35	4	0,22	B58	2	0,11
B10	14	0,78	B36	9	0,50	B59	1	0,06
B14	16	0,89	B37	8	0,44	B60	1	0,06
B15	10	0,56	B38	10	0,56	B61	1	0,06
B17	6	0,33	B39	18	1,00	B62	14	0,78
B19	3	0,17	B41	17	0,94	B65	3	0,17
B20	3	0,17	B42	4	0,22	B67	14	0,78
B21	14	0,78	B44	18	1,00	B68	3	0,17
B22	18	1,00	B45	1	0,06	B79	14	0,78
B24	18	1,00	B46	4	0,22	B70	4	0,22
B28	3	0,17	B48	14	0,78			
B29	5	0,28	B50	14	0,78			
Nombre d'individus	18			18			18	

b. Distances génétiques

Les distances génétiques entre 18 accessions étudiées ont été calculées sur la base des données des globulines et en utilisant la distance Euclidienne. Les résultats figurent dans le tableau 10.

Les valeurs obtenues montrent une dissimilarité entre les accessions étudiées qui se varient entre 0.00 et 5.74. Mo13 et Mo14 sont les deux accessions 100 % similaires (valeur de distance 0.00), elles ont été collectées dans des régions géographiquement éloignées, Médéa et Guelma pour les deux accessions respectivement. Ces deux accessions (Mo13 et Mo14) ont été faiblement distantes aux accessions Mo4 (Chaabet erssas/ Constantine) et Mo12 (Ain Defla) avec une valeur de distance 1.00. Cette valeur a été observée également entre Mo12 (Ain Defla) et les trois accessions Mo9 (Bouira), Mo10 (Alger) et Mo11 (Blida). Par ailleurs, La valeur de distance la plus élevée a été notée entre Mo17 (Batna) et Mo3 (Chettaba/ Constantine), suivie par d'autres valeurs légèrement moins élevées et intermédiaires.

Tableau 10. Distances génétiques obtenues entre les accessions de *M. orbicularis*.

	Mo1	Mo2	Mo3	Mo4	Mo5	Mo6	Mo7	Mo8	Mo9	Mo10	Mo11	Mo12	Mo13	Mo14	Mo15	Mo16	Mo17	Mo18
Mo1	0,00	2,65	2,65	2,24	2,83	2,65	2,00	2,45	2,00	2,00	2,45	2,24	2,00	2,00	4,47	5,00	5,29	4,80
Mo2		0,00	2,00	2,00	2,24	2,83	2,65	2,65	2,65	2,65	2,24	2,45	2,24	2,24	4,58	5,29	5,39	5,10
Mo3			0,00	1,41	2,24	2,83	3,00	3,00	2,24	2,24	2,24	2,00	1,73	1,73	4,80	5,48	5,74	5,29
Mo4				0,00	1,73	2,83	3,00	3,00	1,73	1,73	1,73	1,41	1,00	1,00	4,58	5,29	5,57	5,10
Mo5					0,00	2,24	3,16	3,46	2,00	2,00	2,00	1,73	2,00	2,00	4,69	5,20	5,48	5,20
Mo6						0,00	2,24	3,32	2,65	2,65	3,00	2,83	3,00	3,00	5,00	5,29	5,57	5,29
Mo7							0,00	2,83	2,83	2,83	3,16	3,00	2,83	2,83	4,47	5,00	5,29	4,80
Mo8								0,00	2,83	2,83	2,83	3,00	2,83	2,83	4,90	5,39	5,48	5,20
Mo9									0,00	1,41	1,41	1,00	1,41	1,41	4,47	5,20	5,48	5,00
Mo10										0,00	1,41	1,00	1,41	1,41	4,69	5,20	5,48	5,00
Mo11											0,00	1,00	1,41	1,41	4,69	5,39	5,48	5,20
Mo12												0,00	1,00	1,00	4,58	5,29	5,57	5,10
Mo13													0,00	0,00	4,47	5,20	5,48	5,00
Mo14														0,00	4,47	5,20	5,48	5,00
Mo15															0,00	3,61	3,74	3,00
Mo16																0,00	1,73	2,00
Mo17																	0,00	2,65
Mo18																		0,00

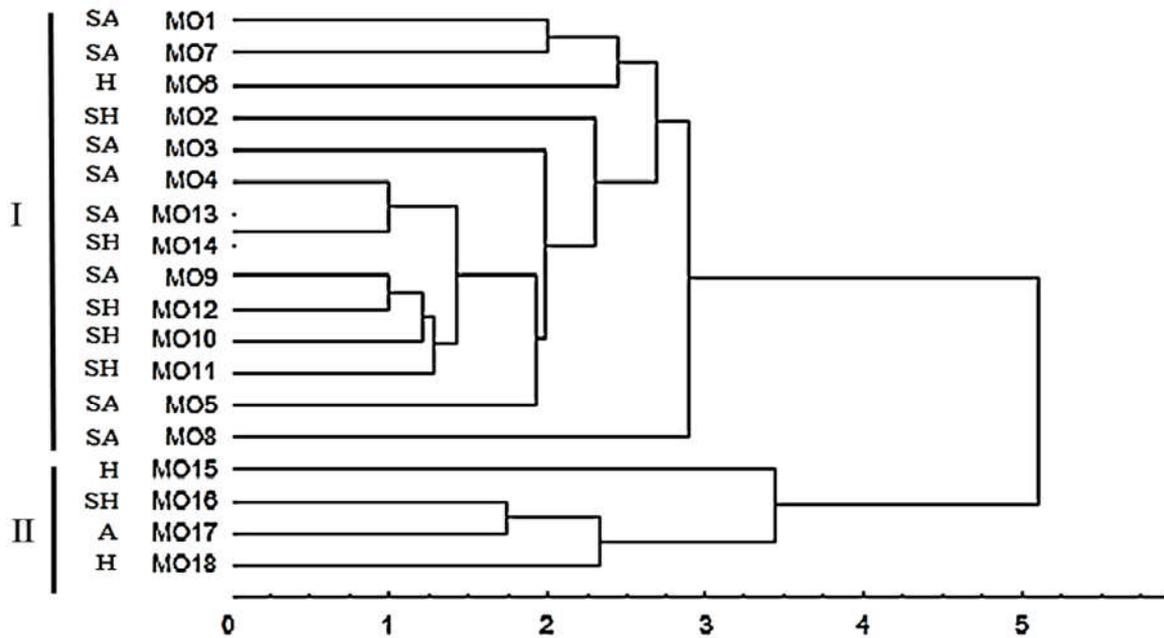
c. Classification hiérarchique

Un dendrogramme UPGMA (fig. 15) a été construit sur la base des profils des globulines chez 18 accessions de l'espèce *M. orbicularis*.

Le dendrogramme obtenu illustre une classification probable des accessions analysées. Selon la distance d'agrégation les accessions étudiées sont subdivisées en deux ensembles distincts à une distance $d= 5.10$. Le 1^{er} ensemble majeur (I) renferme la plupart des accessions (14 accessions) appartenant à des régions avec différents étages bioclimatiques qui se varient de l'humide au semi-aride. Il est subdivisé lui-même en trois groupes ; Trois accessions (Mo1, Mo7 et Mo6) collectées dans des régions assez éloignées (Oued Athmenia, Achir et Tipaza, respectivement) forment le 1^{er} groupe à une distance $d= 2.44$. Le 2^{ème} groupe est composé de 10 accessions à la valeur de distance $d=2.29$, ces accessions ont été récoltées dans des régions à climat varie entre subhumide et semi-aride. Parmi les accessions de ce groupe, Mo13 (Médéa) et Mo14(Guelma) ont montré une similarité complète (100 %). A la distance $d= 2.91$ se détache une accession Mo8 (Sidi Bel Abbes) du 1^{er} ensemble majeur pour former le 3^{ème} groupe.

Le seconde ensemble majeur (II) réunit quatre accessions récoltées dans l'Est Algérien ; Mo15 (Annaba), Mo16 (Sétif), Mo17 (Batna) et Mo18 (Jijel).

Fig. 15. Classification hiérarchique en UPGMA des 18 accessions de *M. orbicularis* basée sur le polymorphisme des globulines



II.2.4. Chez l'espèce *M. murex*

L'analyse intra-spécifique de l'espèce *M. murex* sur la base des globulines a permis de générer des profils électrophorétiques hétérogènes.

a. Fréquences des globulines

À travers les 12 accessions analysées, un total de 35 bandes de fréquences différentes ont été détectées pour cette espèce (Tableau 11). D'après le tableau ci-dessous, nous notons un polymorphisme important des bandes des globulines. L'observation de ces dernières dans l'ordre décroissant des fréquences montre, que les bandes B31, B37, B39, B40, B41, B43, B45 sont omniprésente avec un pourcentage 100%. Elles sont alors considérées monomorphes. Suivies par les bandes B42, B57, B59, B66, B67 et B69 qui sont considéré les plus fréquentes avec des fréquences varient entre 0.67 à 0.92. Des fréquences intermédiaires (0.42 à 0.58) ont été enregistrées dans les quatre bandes B27, B5 3, B54 et B55. Les bandes restées représentent des fréquences faibles, parmi elles 9 bandes (B14, B15, B32, B47, B58, B60, B62, B64, B65) ont été détectées chez une seule accession chacune avec la valeur de fréquence 0.08. Aucun marqueur spécifique n'a été détecté pour *M. murex*.

Tableau 11. Fréquences des 35 globulines observées chez les accessions de *M. murex*

Globulines	N	Fréquence	Globulines	N	Fréquence	Globulines	N	Fréquence
B1	4	0,33	B39	12	1,00	B57	9	0,75
B2	2	0,17	B40	12	1,00	B58	1	0,08
B3	2	0,17	B41	12	1,00	B59	10	0,83
B5	3	0,25	B42	10	0,83	B60	1	0,08
B14	1	0,08	B43	12	1,00	B61	2	0,17
B15	1	0,08	B45	12	1,00	B62	1	0,08
B16	4	0,33	B47	1	0,08	B63	1	0,08
B20	2	0,17	B50	3	0,25	B64	1	0,08
B27	7	0,58	B53	5	0,42	B66	9	0,75
B31	12	1,00	B54	7	0,58	B67	8	0,67
B32	1	0,08	B55	7	0,58	B69	11	0,92
B37	12	1,00	B56	3	0,25			
Nombre d'individus	12			12			12	

b. Distances génétiques

La comparaison des accessions de *M. murex* de point de vue polymorphisme en globulines nous a permis de calculer les distances génétiques existantes entre elles. Les résultats sont présentés sous forme d'une matrice de distances Euclidiennes dans le tableau 12.

Tableau 12. Distances génétiques obtenues entre les accessions de *M. murex*

	Mmx1	Mmx2	Mmx3	Mmx4	Mmx5	Mmx6	Mmx7	Mmx8	Mmx9	Mmx10	Mmx11	Mmx12
Mmx1	0,00	3,16	3,00	3,16	3,16	4,24	3,32	2,83	3,00	3,46	2,00	3,74
Mmx2		0,00	2,24	2,83	2,83	4,00	3,32	2,83	3,32	3,16	2,83	4,24
Mmx3			0,00	2,65	2,65	4,12	3,16	3,00	2,83	3,32	2,24	4,12
Mmx4				0,00	1,41	3,74	1,73	2,00	1,73	2,45	2,45	3,46
Mmx5					0,00	4,00	2,24	2,00	2,24	2,45	2,45	3,74
Mmx6						0,00	3,32	3,74	3,61	3,46	4,00	3,46
Mmx7							0,00	1,73	1,41	2,24	2,65	3,00
Mmx8								0,00	1,73	2,45	2,45	3,46
Mmx9									0,00	2,65	2,24	3,32
Mmx10										0,00	2,83	3,46
Mmx11											0,00	3,46
Mmx12												0,00

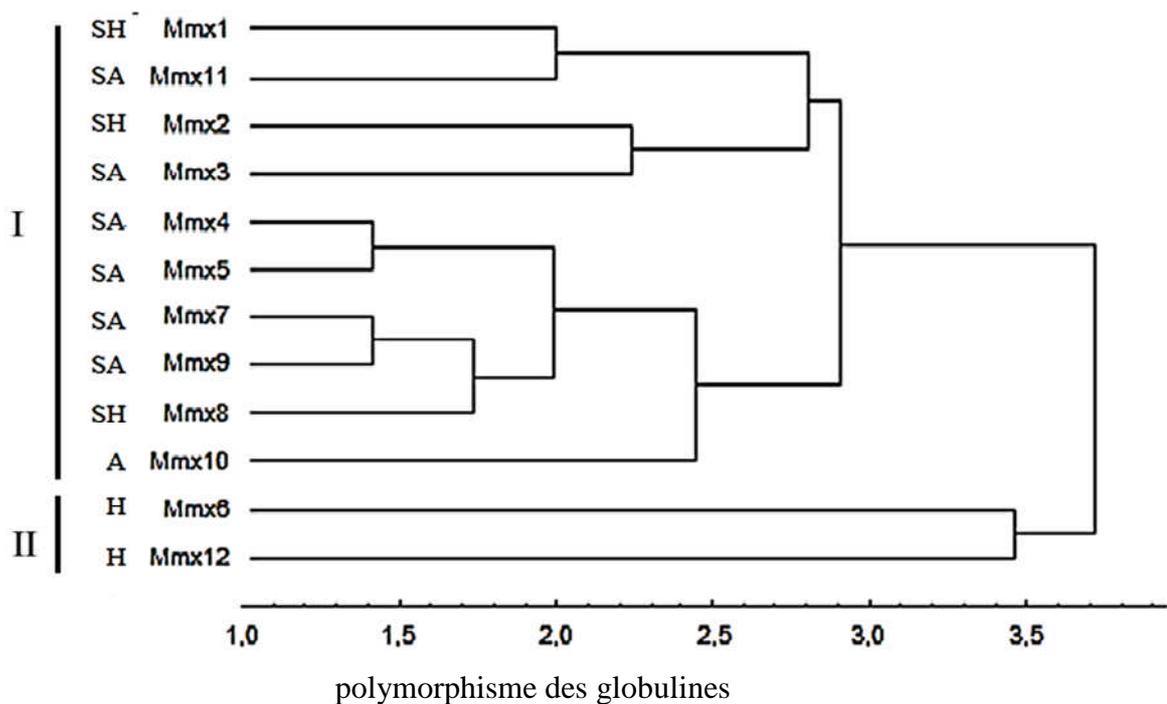
Nous observons que les valeurs de distances entre les différentes accessions de l'espèce *M. murex* varient entre 1.41 et 4.24. La valeur la plus faible (1.47) a été notée entre des accessions géographiquement éloignées ; Mmx5 (Bouira) et Mmx4 (Chabet ernessas/Constantine) et entre Mmx9 (Médéa) et Mmx7 (Ain Defla). Par contre la distance génétique la

plus élevée a été enregistrée entre les accessions Mmx6 (Alger) et Mmx1(Mila) et les deux accessions Mmx12 (Annaba) et Mm2 (Beni Hemiden/ Constantine) avec la valeur 4.24, suivie par la valeur 4.12 entre les accessions Mmx6 et Mmx 3, Mmx12 et Mmx3 (Chettaba/ Constantine). Comme nous observons des valeurs intermédiaires pour les autres accessions.

c. Classification hiérarchique

Un dendrogramme en UPGMA représenté dans la figure 16 agrège les 12 accessions de *M. murex* au niveau de distance $d=3.71$, en deux groupes distincts. Le 1^{er} groupe (I) est subdivisé lui-même en deux sous-groupes ; le 1^{er} est composé de quatre accessions collectées dans les régions de Mila (Mmx1) et Constantine (Mmx2 et Mmx3) sauf l'accession Mmx11 a été collectée dans la région de Guelma, le 2^{ème} sous-groupe est composé de six accessions collectées dans des régions du centre Algérien à l'exception de l'accession Mmx4 qui a été collectée dans l'est (Chaabet erssas/ Constantine). Deux accessions (Mmx6 et Mmx12) constituent le 2^{ème} groupe (II) à une distance $d=3.46$, ces deux accessions ont été collectées dans des régions distantes (Alger et Annaba, respectivement) mais caractérisées par un climat humide.

Fig. 16. Classification hiérarchique en UPGMA des 12 accessions de *M. murex* basée sur le



II.2.5. Chez l'espèce *M. rigidula*

L'étude intra-spécifique de *M. rigidula* a porté sur trois accessions seulement, collectées dans trois sites différents de la région Bordj Bouariridj. Ces accessions ont montré une hétérogénéité des profils électrophorétiques, et chaque accession a été caractérisée par au moins une bande unique de globulines.

a. Fréquences des globulines

Les différentes bandes des globulines observées dans les trois zones des différentes accessions de l'espèce *M. rigidula* sont en nombre de 28 bandes avec des mobilités et fréquences différentes (Tableau 13).

Globulines	N	Fréquence	Globulines	N	Fréquence	Globulines	N	Fréquence
B5	1	0,33	B31	1	0,33	B55	1	0,33
B6	3	1,00	B33	2	0,67	B56	2	0,67
B10	3	1,00	B35	3	1,00	B57	1	0,33
B12	2	0,67	B37	3	1,00	B58	1	0,33
B16	2	0,67	B40	3	1,00	B65	3	1,00
B20	1	0,33	B42	1	0,33	B66	3	1,00
B24	1	0,33	B43	3	1,00	B67	3	1,00
B25	1	0,33	B45	3	1,00	B68	1	0,33
B27	3	1,00	B51	1	0,33			
B30	2	0,67	B53	3	1,00			
Nombre d'individus	3			3			3	

Tableau 13. Fréquences des 28 globulines observées chez les accessions de *M. rigidula*

D'après le tableau, 12 bandes de globulines (B6, B10, B27, B35, B37, B40, B43, B45, B53, B65, B66, B67) ont été partagées par les trois accessions de *M. rigidula*, avec une fréquence maximale 1.00. La fréquence la plus faible (0.33) a été enregistrée dans 11 globulines (B5, B20, B24, B25, B31, B42, B51, B55, B57, B58, B68), ces bandes ont été présentes dans une seule accession chacune, mais, ce ne sont pas spécifique à l'espèce car elles sont présentes dans d'autres accessions des autres espèces étudiées. Les bandes des globulines restées ont été caractérisée par la valeur de fréquence intermédiaire 0.67 (Tableau 13), elles ont été partagées par deux accessions chacune.

b. Distances génétiques

Les distances génétiques entre les accessions de *M. rigidula* ont été calculées sur la base des profils des globulines et les résultats figurent dans le tableau 14. La distance la plus élevée (4.00) a été enregistrée entre MRg1 et MRg3 prélevée dans deux sites assez éloignées, Ain Zada (Semi-Aride) et Mansoura (Subhumide) pour les deux accessions, respectivement. Une distance génétique légèrement moins élevée que la précédente (3.61) a été notée entre l'accension MRg2 qui a été collectée dans un site Semi-aride (Achir) et l'accension MRg3. Les deux accessions les plus proches sont MRg1 et MRg2 avec une valeur de distance 1.73. Ces dernières ont été collectées dans deux sites représentatifs d'un climat semi-aride.

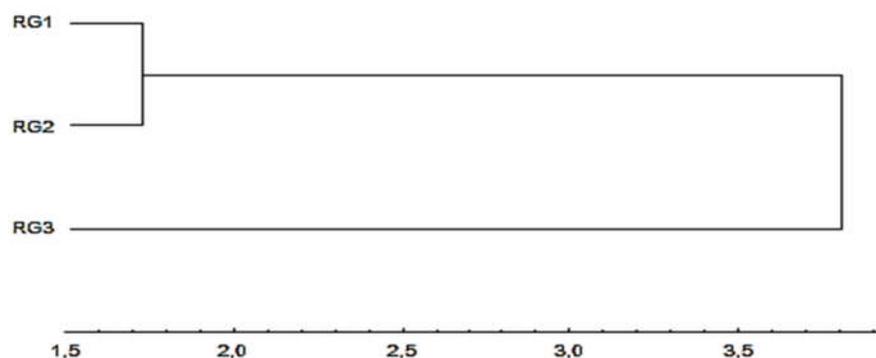
Tableau 14. Distances génétiques obtenues entre les accessions de *M. rigidula*

	MRg1	MRg2	MRg3
MRg1	0,00	1,73	4,00
MRg2		0,00	3,61
MRg3			0,00

c. Classification hiérarchique

Un dendrogramme (Fig. 17) a été élaboré sur la base des profils des globulines des trois accessions de *M. rigidula*, selon la distance génétique et la méthode d'agrégation UPGMA.

Fig. 17. Classification hiérarchique en UPGMA des trois accessions de *M. rigidula* basée sur le polymorphisme des globulines



Le dendrogramme de ces trois accessions définit deux groupes majeurs ou cluster à une distance $d=3.80$. Le 1^{er} groupe se compose de deux accessions qui forment entre elles un clade à une valeur de distance $d=1.73$, ces deux accessions ont été collectées dans deux sites assez éloignés de la région bordj bouaridj (BBA) mais caractérisés par un climat semi-aride.

Le 2^{ème} groupe est formé d'une seule accession (MRg3) la plus distante, prélevée d'un autre site différent de la même région (Mansoura) mais dispose d'un climat subhumide.

III. Discussion

Les protéines de réserve des graines de différentes espèces ont été étudiées en détail à partir de la fin du siècle, quand Osborne en 1924, les classait en quatre groupes sur la base de leurs critères de solubilité : les albumines (solubles dans l'eau), les globulines (solubles dans les solutions salines), les gluténines (solubles dans des solutions légèrement acides ou basiques) et les prolamines (solubles dans l'alcool).

Toutefois, il est bien connu qu'une distinction claire entre ces groupes de protéines n'est pas toujours possible, à cause de nombreuses protéines montrant des comportements de solubilité intermédiaires. À cet égard, certaines albumines de semences ont été identifiées à partir de plusieurs espèces de plantes qui se comportent comme des globulines lors de leur solubilisation (Youle et Huang, 1978). Blagrove et Gillespie (1975) ont également noté que les globulines sont en partie solubles dans de l'eau dés-ionisée. Dans le présent travail, nous avons réussi à mettre au point une procédure d'extraction efficace de la fraction totale des globulines (Franco *et al.*, 1997).

L'hétérogénéité électrophorétique des protéines de réserve représentent un caractère biochimique génétiquement stable. Nos résultats, basés sur 81 accessions de cinq espèces du genre *Medicago* L. échantillonnées dans diverses conditions écogéographiques en Algérie du Nord, mettent en évidence une différenciation significative au niveau inter et intra-spécifique.

L'électrophorèse des globulines par SDS-PAGE a révélé trois zones de migration (A, B et C). À travers toutes les espèces étudiées 70 bandes sont séparées dans les trois zones avec une résolution nette. Le grand intervalle de variation des fréquences de ces bandes (de 0 à 100 %) reflète la grande diversité existante à l'échelle inter et intra-spécifique. Ce polymorphisme en protéines peut être expliqué par le fait que ces populations ne vivent pas dans le même climat, et subissent donc des conditions différentes. Ainsi que, la composition protéique peut être sous la dépendance des facteurs génétiques et agro climatique (Doekes et Wennekes, 1982).

Des marqueurs spécifiques ont été enregistrés chez les deux espèces *M. ciliaris* et *M. orbicularis* uniquement, mais avec des faibles fréquences pour chaque marqueur, ce qui les rend moins utiles pour l'identification des espèces, d'où, un plus grand nombre d'accession doit être essayé pour obtenir des résultats plus précis.

Globalement, la classification hiérarchique entre les espèces étudiées concorde avec les critères taxonomiques et regroupe les espèces qui ont un ancêtre commun (Lesins and Lesins, 1979). Au sein de chaque espèce une comparaison entre les différentes accessions a été effectuée selon les distances Euclidiennes. Les distances génétiques entre les populations étudiées ont été représentées. A la lumière de ces résultats une classification hiérarchique a été élaborée.

On note que les accessions s'organisent en groupes et sous- groupes. En effet, nous avons défini deux groupes majeurs dans chaque espèce étudiée. La structuration des différentes accessions et la classification hiérarchique des groupes obtenus mettent en relief le degré de similarité et de diversité entre les populations étudiées. Par contre, le regroupement des différentes populations n'a pas été clairement corrélé à leurs origines géographiques.

Les 81 accessions étudiées ont déjà été analysées (Medoukali et *al.*, 2015) en utilisant 12 caractères morphologiques liés à la taille des graine, des gousses et des cotylédons, ainsi que deux systèmes enzymatiques (Estérases et Glutamate oxaloacétate transaminase). Un polymorphisme élevé a été mis en évidence et tous les caractères étudiés ont contribué à la discrimination des espèces et des accessions. Pareillement, La relation entre les marqueurs morphologiques et les paramètres éco géographique a été estimée faible.

Ce travail vise à apprécier de la variabilité génétique de cinq espèces (*M. truncatula*, *M. ciliaris*, *M. orbicularis*, *M. murex* et *M. rigidula*) du genre *Medicago* L. représentées par 81 accessions et collectées dans différentes régions dans le Nord Algérien en utilisant une fraction de protéines de réserve de la graine (globulines) comme marqueur.

Notre première préoccupation était d'obtenir la meilleure expression possible des globulines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions non dénaturantes (SDS-PAGE). Pour cela, nous avons mis au point un protocole d'extraction des globulines à partir des graines matures des 81 accessions concernées.

L'analyse électrophorétique de cette fraction protéique nous a permis de :

- Répertoire 70 bandes de globulines à travers toute la collection avec des mobilités et fréquences très variables, dont 38 bandes ont été notées chez l'espèce *M. truncatula*, 52 bandes chez *M. ciliaris*, 46 bandes chez *M. orbicularis*, 35 bandes chez *M. murex* et 28 bandes chez *M. rigidula*.
- Analyser la diversité génétique au niveau intra et interspécifique ce qui nous a aidé à estimer les distances génétiques entre taxons et entre pools géniques au sein d'une même espèce biologique.
- Réaliser une évaluation de la position taxonomique et une caractérisation phylogénétique des différentes espèces de la collection.
- Détecter plusieurs bandes de globulines spécifiques aux espèces *M. ciliaris* et *M. orbicularis*. Ces bandes peuvent être des marqueurs d'un grand intérêt pour l'identification de ces espèces.

L'utilisation d'autres marqueurs biochimiques et moléculaires devrait permettre de mieux comprendre la structuration de la diversité génétique et le rôle des facteurs écologiques dans la différenciation de ces espèces Algériennes du genre *Medicago*, ce qui peut donner une indication sur le modèle d'évolution appliqué aux accessions étudiées dans leurs conditions environnementales

- Laouar M., Abdelguerfi A., Bouznad Z., Guittonneau G.G. 2003.** Autoécologie et distribution du complexe d'espèces *M. rigidula* et *M. intertexta* en Algérie. *Acta Botanica Gallica*. 10:253-265.
- Blagrove R. J., Gillespie J. M. 1975.** Isolation, purification and characterization of the seed globulins of *Lupinus angustifolius*. *Aust. J. Plant Physiol.* 2:13-27.
- Broughton W.J., Hernandez G., Blair M., Beebe S., Gepts P., Vanderleyden J. 2003.** Beans (*Phaseolus* spp.). Model food legumes. *Plant and soil*. 252:55-128.
- Chalck P.M. 1998.** Dynamics of biologically fixed N in legume-cereal rotations: *a review*. *Aust. J. Res.* 49:303-316.
- Cherifi K. 1996.** Polymorphisme enzymatique de quelques populations naturelles de *Medicago ciliaris* (L.) Krock et de *Medicago intertexta* (L.) Mill. *Acta Botanica Gallica*. 1: 165-155.
- De Lajudie P., Willems A., Nick G., Moreira F., Molouba F., Hoste B., Torck U., Neyra M., Collins M.T., Lindström K., Dreyfus B., Gillis M. 1998.** Characterization Of tropical tree rhizobia and description of *Mesorhizobium plurifarum* sp. *Nov. Int. J. Syst. Bactriole*. 48:369-382.
- Delalande M., Greene S., Hughes S., Nair R., Huguet T., Aouani M.E., Prospero J.M. 2007.** *Wild accessions / populations Medicago truncatula handbook*. Pp. 1-27.
- Derek Munro B., Ernest S. 1997.** Les légumes du *Canada*. *NRC Research Press*. Pp. 279-280.
- Dommergues Y., Duhoux E., Diem H.G. 1999.** *Les arbres fixateurs d'azote*. (Ed) CIRAD, ESPACE, FAO, IRD. pp.499
- Doyle J.J., Luckow M.A., 2003.** The rest of the iceberg. Legume diversity and evolution in a Phylogenetic context. *Plant Physiol*. 131:900-910.
- Doyle J.J. 1994.** Phylogeny of the legume family: an approach to understanding the origins of nodulation. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 25:325–349.
- Fyad Lameche F.Z. 2007.** Les Légumineuses ou Fabacées. Cours présentés à la faculté des Science. Département de Biotechnologie. Université d'Oran Es-senia. Algérie.

- Genier G., Guy P., Prosper J.M. 1992** *Les luzernes. In : Gallais A. et Bannerot. H: Amélioration des espèces végétales cultivées : objectifs et critères de sélection.* INRA Editions, 323-338.
- Gepts P., Beavis W.D., Brummer E. C., Shoemaker R. C., Stalker H.T., Weeden Graham, P.H. et Vance C.P. 2003** Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant Physiol.* 131: 872- 877.
- Hamilton R.S., Hughes S.J., Maxted N. 2001** *Ex Situ conservation of forage legumes. In The Genetic Diversity of Legumes species in the Mediterranean, Host plant by mitogenic lipo-oligosaccharides of Rhizobium. Science.257: 70-71.*
- Harrison M.J. 1999** Molecular and cellular aspects of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50 : 361-389.
- Harry M. 2001** : Génétique moléculaire et évolutive. Maloine. Paris. P15.
- Heyn C.C. 1963.** The annual species of Medicago. *Scripta Hierosolymitana.* Publications of the Hebrew University. Jerusalem. 154p.
- Hireche Y. 2006** Réponse de la luzerne (*Medicago sativa* L) au stress hydrique et à la profondeur de semis. Université al hadj lakhdar. Thèse de magistère. Batna
- Hireche Y. 2006** : Réponse de la luzerne (*Medicago sativa* L) au stress hydrique et à la profondeur de semis. Université al hadj lakhdar. Thèse de magistère. Batna
- Lapeyronie A. 1982** Les productions fourragères méditerranéennes - technique agricole et production méditerranéenne. *Maisonneuve et Larose. Paris.* Pp 307-315.
- Lapeyronie A. 1982** Les productions fourragères méditerranéennes - technique agricole et production méditerranéenne. Maisonneuve et Larose. Paris. Pp 307-315.
- Lecoeur, J. 2005** Développement de la plante pp. 27-36 in *Agro physiologie du pois Protéagineux*, Munier-Julian N., Biarnès, V., Chaillet, 1, Lecoeur J. In addition, Jeuffroy M.H. (2005). (Paris INRA).
- Lee G.J., Wu. X., Shannon J. G., Sleper D. A., Nguyen H. T. 2007** Chapter 1: Soybean. *Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants Oilseeds*, de 1-53.C. Kole (Ed.). © Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

- Lesins K. A., Lesins I. 1979** Genus *Medicago* (Leguminosae), a taxogenetic study. *Plant ecology*. 50 de 228- 229.
- Levêque C. 2001** Ecologie : De l'écosystème à la biosphère. Masson Sciences. Dunod, Paris. 502p.
- Lewis G.P., Schrire B.D., Mackinder B.A., Lock J.M., ed. 2003.** Legumes of the World. Royal Botanic Gardens, Kew, UK.
- Mathieu M. 2003** *Luzerne* : culture, récolte, conservation, utilisation. *France agricole*. Pp 11-16.
- Medoukali I., Bellil I., Khelifi D. 2015.** Morphological and Isozyme Variation in Natural Populations of the Genus *Medicago* L. Prospected in Northern Algeria. *Not Bot Horti Agrobo*. 43(1) DOI: 10.15835/nbha4319676.
- Michaud R., Lehman W.F., Rumbaugh M.D. 1988** World distribution and Historical Development. In Alfalfa and alfalfa improvement. *Agronomy monograph* n°29. USA, 25-89.
- Moulaï, D. 2009** Recherche de marqueurs génétiques liés à la tolérance à la salinité chez des écotypes d'espèces annuelles de *Medicago*. Mémoire de Magister. Université d'Oran-Es-Sénia. Algérie. pp. 6-7.
- N.F., Young N.D. 2005** Legumes as a Model Plant Family. Genomics for Food and Feed Report of the Cross-Legume Advances through Genomics Conference. *Plant Physiology* 137: 1228–1235.
- Nègre R. 1959** Révision des *Medicago* d'Afrique du Nord. Bull. Soc. Hist. Nat. De L'Afrique du Nord 50,267-3 14.
- Osborne T. B. (1924).** The Vegetable Proteins; Longmans, Green: London.
- Pawlowski K. 1997** Nodule-specific gene expression. *Physiol. Plantarum* 99 : 617-631.
- Prosperi J., Guy P., balfourier F. 1995** : ressources génétiques des plantes fourragères à gazon, ed. INRA, paris.
- Prosperi J. M., Isabelle O., Angevain M., Génier G., Nansat P. 1993** Diversité génétique, Conservation et utilisation des ressources génétiques des luzernes méditerranéennes. Laboratoire de Ressources génétiques et d'Amélioration des luzernes méditerranéennes. *INRA. Mauguio*. N°4 : 1-5.

- Prosperi JM., Guy P., Genier G., Angervian. M. 1995** Ressources génétiques des plantes fourragères et à gazon (paris : INRA).
- Prosperi JM., Guy P., Genier G., Angervian. M. 1995** Ressources génétiques des plantes fourragères et à gazon (paris : INRA).
- Quézel P., Santa S. 1963** Nouvel flore de l'Algerie et des régions désertiques méridionales.CNRS.Paris.
- Sahgal M., Johri B. N. 2003** The changing face of rhizobial systematics. *Current Science*. 84 (1): 43-48.
- Schoutteten F. 2004** La luzerne fiche technique agro-industrie. CRCI/ARIST Champagne-Ardenne p, 15.
- Schultze M., Kondorosi A. 1998** Regulation of symbiotic root nodule development. *Annu. Rev. Genet.* 32: 33-57.
- Simon, J-P. 2005** Plantes utilisées par l'Homme : chapitre 11 les légumineuses. Préparés pour le département de Sciences biologiques. Université de Montréal.
- Small E., Jomph M. 1989** a synopsis of the genus Medicago (Leguminosae). *Can. J. Bot.* 67, 3260-3294.
- Small E., Jomph M. 1989** a synopsis of the genus Medicago (Leguminosae). *Can. J. Bot.* 67, 3260-3294.
- TAM S-M ., 2006.** Caracterisation dela diversité genetique chez la tomate. Les actes du BRG P 6 ,8 ,1.
- Thami Alami I., El-Mzouri E.H. 2000** Etude de l'efficacité et de la persistance des souches de Rhizobium de sulla. *CIHEAM - Options Mediterraneennes*. 2: 321-325.
- Wani S. P., Rupela O. P. and K.K. Lee. 1995** Sustainable agriculture in the semi-arid tropics through biological nitrogen fixation in grain legumes. *Plant ant Soil* 174: 29-49.
- YAHIA. N & FYAD-LAMECHE. F.Z** Évaluation de la variabilité de jeunes plants de Medicago soumis à un régime de basse température. 2003, p. 3- 17 - Départ. /Région : Algérie, Acta Botanica Gallica, 1, Tome 150 - Fascicule 1.
- Youle R. J., Huang A. H. C. (1978).** Albumin storage proteins in the protein bodies of castor bean. *Plant Physiol.* 61:13-16.

Annexe 1. Solutions utilisées pour la SDS-PAGE**Solution mère d'acrylamide à 40% (à préparer avec gants et masque)**

- Acrylamide 40 g
- Eau distillée 100 ml

Solution mère de bisacrylamide à 2 % (à préparer avec gants et masque)

- Bisacrylamide 2 g
- Eau distillée 100 ml

Solution stock de SDS à 10 %

- Sodium Dodécyl Sulfate (SDS) 10 g
- Eau distillée 100 ml

Solution d'Ammonium persulfate à 1% (à préparer temporairement)

- APS 0.1 g
- Eau distillée 10 ml

Tampon Tris HCl pH 8,8 (à préparer sous la hotte, avec gants et masque)

- Tris 60,57 g
- Eau distillée qsp 400 ml
- Ajuster à pH 8,8 avec du HCl fumant 8 à 10 ml
- Eau distillée qsp 500 ml

Tampon Tris HCl pH 6,8 (à préparer sous la hotte, avec gants et masque)

- Tris 30,285 g
- Eau distillée qsp 200 ml
- Ajuster à pH 6,8 avec du HCl fumant 19,5 ml
- Eau distillée qsp 250 ml

Tampon d'électrophorèse

- Glycine 70,55 g
- Tris 15 g
- SDS 5 g
- Eau distillée qsp 5000 ml

Annexe 1. (Suite)**Solution de coloration (pour deux gels)**

- TCA 60% 100 ml
- Solution mère de bleu de coomassie R250 25 ml
- Eau distillée qsp 500 ml

Solution mère de bleu de Coomassie R250

- Bleu de Coomassie R250 10 g
- Ethanol 95° qsp 1000 ml

L'éthanol est mis en agitation, le bleu de Coomassie est ensuite ajouté, pour qu'il ne prenne pas de masse, laisser agiter au moins deux heures, la solution est ensuite filtrée.

Annexe 2. Préparation des gels pour la SDS-PAGE**Gel de séparation (running gel) T : 12.25%, C : 0.97%**

▪ Acrylamide	23.9 ml
▪ Bisacrylamide	4.7 ml
▪ Eau distillée	16.5 ml
▪ Tris-HCl pH 8.8	29.3 ml
▪ SDS à 10 %	1 ml
▪ APS à 1%	1.93 ml
▪ TEMED	0.039 ml

Gel de concentration (stacking gel) T : 2.88%, C : 1.42%

▪ Acrylamide	2 ml
▪ Bisacrylamide	0.6 ml
▪ Eau distillée	20.4 ml
▪ Tris-HCl pH 6.8	3.4 ml
▪ SDS à 10 %	0.28 ml
▪ APS à 1%	1.40 ml
▪ TEMED	0.028 ml



Mmx1 Mmx2 Mmx3 Mmx4 Mmx5 Mmx6 Mmx7 Mmx8 Mmx9 Mmx10 Mmx11 Mmx12 Mt(T)

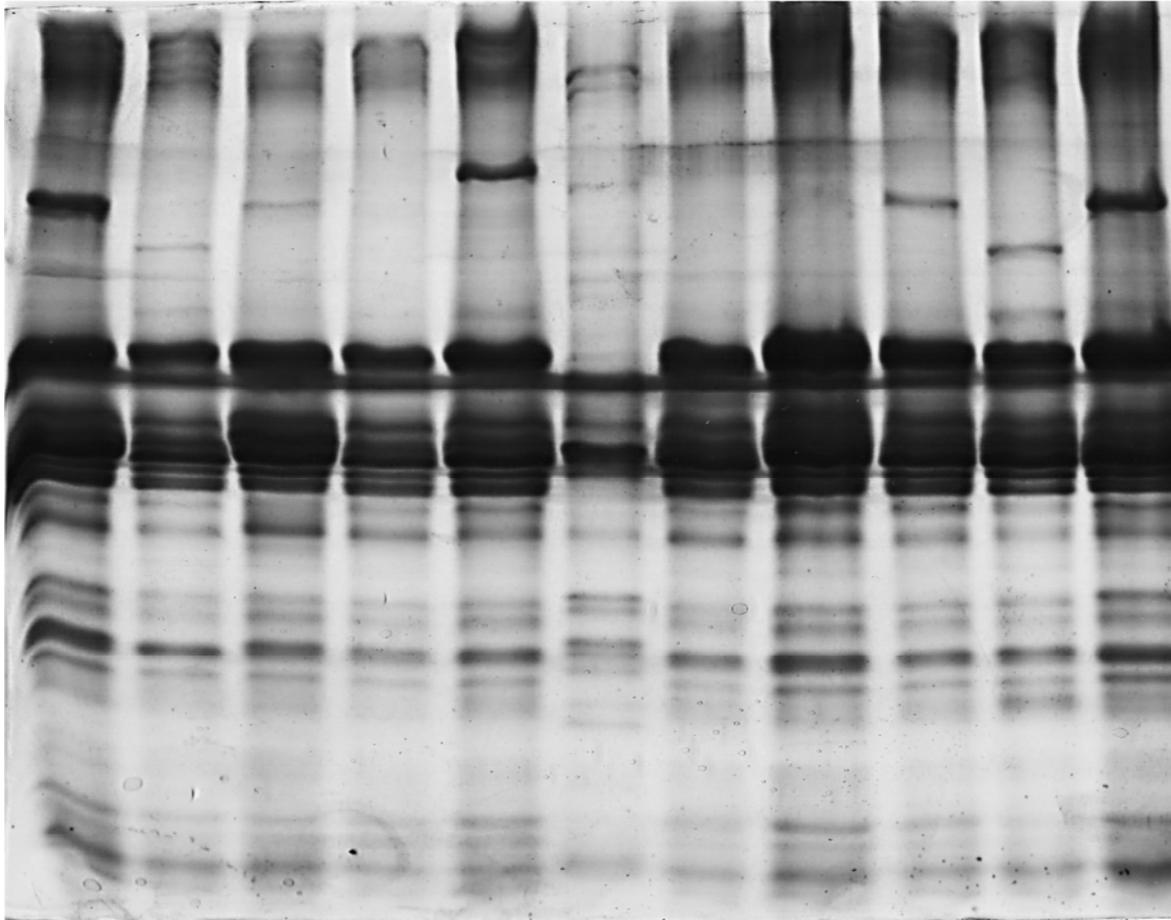


Figure : profils électrophorétique des globuline dans les condition dénaturantes et non réductrices révélées par SDS/PAGE pour *M.murex*

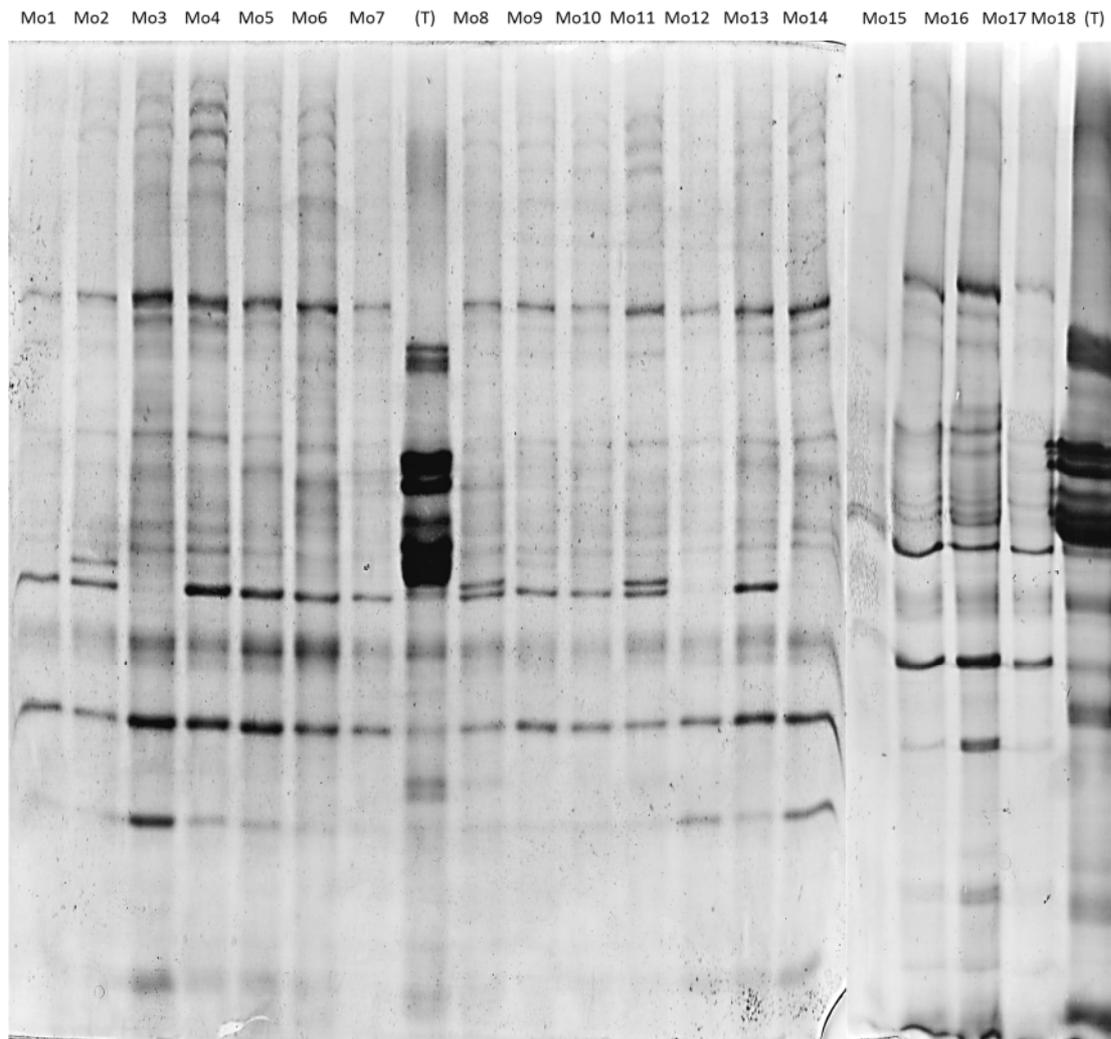


Figure : profils électrophorétique des globuline dans les condition dénaturantes et non réductrices révélées par SDS/PAGE POUR *M.orbicularis*

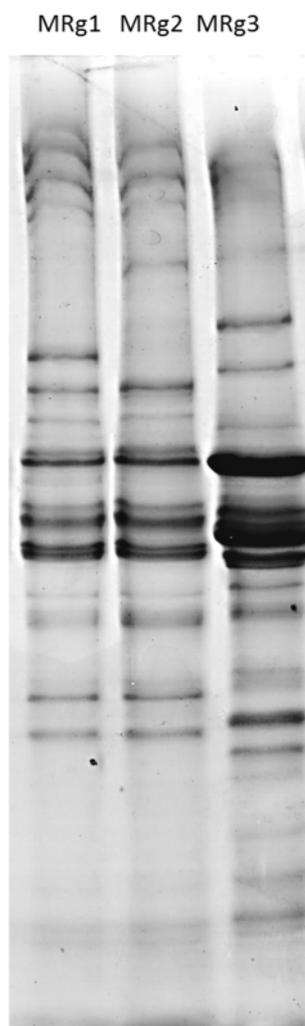


Figure : profils électrophorétique des globuline dans les condition dénaturantes et non réductrices révélées par SDS/PAGE *M.regidula*

Résumé

Le contenu en protéines contribue de manière directe à la compréhension du monde végétal, il est désormais un caractère clé aussi bien à l'étude de la biodiversité qu'en recherche fondamentale, tout en conditionnant un certain nombre de caractères écologiques de la plante elle-même. Notre étude a pour objectif la mise en évidence d'une éventuelle variabilité génétique de la fraction des globulines par la technique d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE), en rapportant sur cinq espèces du genre *Medicago* L. représentées par 81 accessions et collectées dans 36 sites éco-géographiques, couvrant une large gamme des étages bioclimatiques dans le nord Algérien. Globalement, les espèces étudiées ont généré 70 bandes de globulines dont le nombre et les fréquences sont variables d'une espèce à l'autre. En effet, 38 bandes ont été notées chez l'espèce *M. truncatula*, 52 bandes chez *M. ciliaris*, 46 bandes chez *M. orbicularis*, 35 bandes chez *M. murex* et 28 bandes chez *M. rigidula*. Parmi celles-ci, plusieurs bandes de globulines ont été spécifiques aux deux espèces *M. ciliaris* et *M. orbicularis*. L'analyse statistique a montré que les espèces appartenant à différentes sections ont présenté une large variabilité. Le polymorphisme intra-spécifique a été souligné par la classification hiérarchique des accessions. La corrélation avec les origines géographique des populations a été faible. Les programmes d'amélioration devrait prendre en compte le niveau de la diversité génétique inter et intra-spécifique révélé par les globulines.

Mots clés : Globulines, *Medicago*, polymorphisme, SDS-PAGE, Algérie.

Abstract

The protein content directly contributes to the understanding of the plant world; it is now a key character in both the study of biodiversity and basic research, while conditioning a number of ecological characteristics of the plant itself even. Our study aims to highlight a possible genetic variability of globulin fraction by polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), reporting on five species of the genus *Medicago* L. represented by 81 accessions and collected in 36 eco-geographical sites covering a wide range of bioclimatic zones in northern Algeria. Overall, the species studied generated 70 globulins bands whose number and frequencies vary from a species to another. Indeed, 38 bands were observed in the species *M. truncatula*, 52 bands in *M. ciliaris*, 46 bands in *M. orbicularis*, 35 bands in *M. murex* and 28 bands in *M. rigidula*. Of these, several bands globulins were specific to the two species *M. ciliaris* and *M. orbicularis*. Statistical analysis showed that the species belonging to different sections showed a large variability. The intraspecific polymorphism was underlined by the hierarchical classification of accessions. The correlation with the geographical origins of populations was low. Improvement programs should take into account the level of genetic diversity between and within specific revealed by globulins.

Key words: Globulins, *Medicago*, polymorphism, SDS-PAGE, Algeria.

ملخص

يساهم محتوى البروتين بشكل مباشر في فهم عالم النبات، هو الآن طابع مفتاح سواء في دراسة التنوع البيولوجي أو في مجال البحوث الأساسية، شرط تكييف النبات عدد من الخصائص البيئية. تهدف دراستنا إلى تسليط الضوء على مدى إمكانية تقدير الإختلاف الجيني لمجموعة بروتينات الجلوبيولين عن طريق تقنية الهجرة الكهربائية على هلام بولي أكريلاميد، وذلك لدى خمسة أنواع من جنس مديكافو يمثلها 81 فردا والتي تم جمعها في 36 موقعا للبيئة الجغرافية التي تغطي مجموعة واسعة من المناطق المناخية البيولوجية في شمال الجزائر. عموما، الأفراد المدروسة ولدت 70 نوع من الجلوبيولين يختلف عددها من نوع إلى آخر. وقد لوحظ 38 نوع من هذه البروتينات في مديكافو ترينكاتيلا، 52 في مديكافوسيلياريس، 46 في مديكافو أوربيكولاريس، 35 في مديكافو موراكس و28 نوع في مديكافو ريجيدولا. من هذه، وجدنا عدة أنواع الجلوبيولين محددة لكل من النوعين مديكافوسيلياريس ومديكافو أوربيكولاريس. وأظهر التحليل الإحصائي أن الأنواع التي تنتمي إلى قطاعات مختلفة أظهرت تباينا كبيرا. وقد شدد التصنيف الهرمي على الإختلاف الجيني ضمن النوع الواحد. من جهة أخرى، أظهرت الدراسة أن الصلة مع الأصول الجغرافية للأفراد كانت منخفضة. ينبغي لبرامج التحسين أن تأخذ بعين الاعتبار مستوى التنوع الجيني بين وداخل الأفراد المدروس بواسطة بروتينات الجلوبيولين.

الكلمات المفتاحية: جلوبيولين، مديكافو، تعدد الأشكال، الهجرة الكهربائية، الجزائر.

<p>Nom : Kehal Dani prénom : Sarah Ouarda</p>	<p>Date de soutenance : 16/06/2015</p>
<p>Thème : Appréciation de la diversité génétique de cinq espèces du genre <i>Medicago</i> L. collectées dans le Nord Algérien par les marqueurs protéiques (Globulines)</p>	
<p>Diplôme : Master en Biochimie option Biochimie Moléculaire et Santé</p>	
<p>Résumé :</p> <p>Le contenu en protéines contribue de manière directe à la compréhension du monde végétal, il est désormais un caractère clé aussi bien à l'étude de la biodiversité qu'en recherche fondamentale, tout en conditionnant un certain nombre de caractères écologiques de la plante elle-même. Notre étude a pour objectif la mise en évidence d'une éventuelle variabilité génétique de la fraction des globulines par la technique d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE), en rapportant sur cinq espèces du genre <i>Medicago</i> L. représentées par 81 accessions et collectées dans 36 sites éco-géographiques, couvrant une large gamme des étages bioclimatiques dans le nord Algérien. Globalement, les espèces étudiées ont généré 70 bandes de globulines dont le nombre et les fréquences sont variables d'une espèce à l'autre. En effet, 38 bandes ont été notées chez l'espèce <i>M. truncatula</i>, 52 bandes chez <i>M. ciliaris</i>, 46 bandes chez <i>M. orbicularis</i>, 35 bandes chez <i>M. murex</i> et 28 bandes chez <i>M. rigidula</i>. Parmi celles-ci, plusieurs bandes de globulines ont été spécifiques aux deux espèces <i>M. ciliaris</i> et <i>M. orbicularis</i>. L'analyse statistique a montré que les espèces appartenant à différentes sections ont présenté une large variabilité. Le polymorphisme intra-spécifique a été souligné par la classification hiérarchique des accessions. La corrélation avec les origines géographique des populations a été faible. Les programmes d'amélioration devrait prendre en compte le niveau de la diversité génétique inter et intra-spécifique révélé par les globulines.</p>	
<p>Mots clés : Globulines, <i>Medicago</i>, polymorphisme, SDS-PAGE, Algérie.</p>	
<p>Laboratoire de Génétique Biochimie et Biotechnologies Végétales, Département de Biochimie et Biologie Moléculaire et Cellulaire, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Frères Mentouri -Constantine</p>	
<p>Jury de soutenance</p> <p>Présidente : Mlle. Bellil I. Maitre de Conférences. Université Frères Mentouri - Constantine Rapporteur : Mr. Khelifi D. Professeur. Université Frères Mentouri - Constantine Examinatrice : Melle. Benhamdi A. Maitre de Conférences. Université Frères Mentouri- Constantine.</p>	

